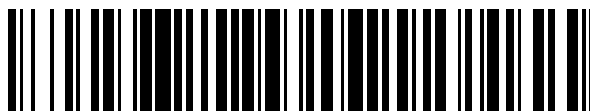


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 126**

51 Int. Cl.:

C07K 1/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2004** **E 04775814 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **14.12.2005** **EP 1603936**

54 Título: **Uso de lectinas para promover la oligomerización de glicoproteínas y de moléculas antigénicas**

30 Prioridad:

28.02.2003 US 450721 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2013

73 Titular/es:

AGENUS INC. (100.0%)
3 Forbes Road
Lexington MA 02421, US

72 Inventor/es:

ZABRECKY, JAMES R. y
MONKS, STEPHEN A.

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 126 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de lectinas para promover la oligomerización de glicoproteínas y de moléculas antigénicas

1. INTRODUCCIÓN

5 0001 La presente invención se refiere a las áreas de terapia biológica, inmunoterapia y modulación inmune mediada por proteína de estrés. Más particularmente, la presente invención se refiere a composiciones y métodos de uso de complejos moleculares que comprenden moléculas de lectina o de tipo lectina asociadas con moléculas inmunológicamente y/o biológicamente activas para aumentar los efectos profilácticos y/o terapéuticos de las moléculas inmunológicamente y/o biológicamente activas para la prevención o tratamiento de enfermedades, en particular para la prevención o el tratamiento de cáncer o enfermedades infecciosas.

10 2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

0002 La cita o discusión de una referencia aquí no podrá ser interpretada como una admisión de que la misma es técnica anterior a la presente invención.

2.1 Respuestas Inmunes y Presentación de Antígenos

15 0003 El sistema inmune de un organismo reacciona con dos tipos de respuestas a los agentes patógenos u otros agentes dañinos: la respuesta humoral y la respuesta mediada por células (véase Alberts, B. et al., 1994, Biología Molecular de la Célula, 1195-96). Cuando las células B en reposo son activadas por antígeno para proliferar y madurar en células secretoras de anticuerpos, producen y secretan anticuerpos con un único sitio de unión al antígeno. Esta reacción secretora de anticuerpos se conoce como la respuesta humoral. Por otro lado, las diversas respuestas de células T se denominan colectivamente reacciones inmunes mediadas por células.

20 Hay dos clases principales de células T, células T citotóxicas y células T coadyuvantes. Las células T citotóxicas directamente matan células que están infectadas con un virus o algún otro microorganismo intracelular. Las células T coadyuvantes, por el contrario, ayudan a estimular las respuestas de otras células: ayudan a activar macrófagos, células dendríticas y células B, por ejemplo (ver Alberts, B. et al., *supra*, en 1228). Tanto las células T citotóxicas como las células T coadyuvantes reconocen el antígeno en la forma de

25 fragmentos de péptidos que son generados por la degradación de los antígenos proteicos extraños en el interior de la célula diana, y ambos, por lo tanto, dependen de moléculas de complejo principal de histocompatibilidad (MHC), que se unen a estos fragmentos de péptidos, los llevan a la superficie celular, y los presentan a las células T. Las moléculas MHC normalmente se encuentran en abundancia en las células presentadoras de antígeno (APCs).

30 0004 Las células presentadoras de antígeno (APCs), como los macrófagos y células dendríticas, son componentes clave de la respuesta inmune innata y adaptativa. Los antígenos son generalmente 'presentados' a las células T o células B en la superficie de otras células, las APCs. Las APCs pueden atrapar antígenos de transmisión linfática y sanguínea y, después de internalización y degradación, presentan fragmentos de péptidos antigénicos, unidos a moléculas de la superficie celular del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), a las células T. Las APCs puede entonces activar células T (respuesta mediada por células) para

35 expansión clonal, y estas células hijas pueden desarrollarse tanto en las células T citotóxicas o células T coadyuvantes, que a su vez activan células B (respuesta humoral) con el mismo antígeno unido a MHC para expansión clonal y producción del anticuerpo específico (ver Alberts, B. et al., *supra*, en 1238-45).

40 0005 Dos tipos de mecanismos de procesamiento de antígeno han sido reconocidos. El primer tipo implica absorción de proteínas mediante endocitosis por APCs, fragmentación de antígeno dentro de vesículas, asociación con las moléculas MHC de clase II y expresión en la superficie celular. Este complejo es reconocido por células T coadyuvantes que expresan CD4. El otro se emplea para proteínas, tales como antígenos víricos, que se sintetizan dentro de la célula y parece implicar fragmentación de proteínas en el citoplasma. Los péptidos producidos de esta manera quedan asociados con moléculas MHC de clase I y son reconocidos por

45 células T citotóxicas que expresan CD8 (ver Alberts, B. et al., *supra*, at 1233-34).

0006 La estimulación de células T implica una serie de moléculas accesorias expresadas tanto por las células T como por las APCs. Las moléculas co-estimuladoras son aquellas moléculas accesorias que promueven el crecimiento y la activación de la célula T. Tras la estimulación, las moléculas co-estimuladoras inducen la liberación de citoquinas, tales como interleucina 1 (IL-1) o interleucina 2 (IL-2), el interferón, etc., que promueven el crecimiento de células T y la expresión de receptores de la superficie (ver Paul, 1989 , Fundamental Immunology, 109-10).

0007 Normalmente, las APCs están en reposo y requieren la activación de su función. La identidad de las señales que activan las APCs es una cuestión crucial y sin resolver (ver Banchereau, et al., 1998, Nature, 392:245-252; Medzhitov, et al., 1998, Curr Opin Immunol., 10:12-15).

2.2 Proteínas de Choque Térmico

0008 Las proteínas de choque térmico (HSPs), también conocidas como proteínas de estrés, se identificaron por primera vez como proteínas sintetizadas por las células en respuesta al choque térmico. Aproximadamente diez familias de HSPs son conocidas, y cada familia consta de uno a cinco proteínas homólogas estrechamente relacionadas. Srivastava, 2002, Annu. Rev. Immunol. 20:395-425. Se encontró posteriormente que muchos miembros de estas familias son inducidos en respuesta a otros estímulos estresantes, incluyendo privación de nutrientes, alteración metabólica, radicales de oxígeno, e infección con patógenos intracelulares (ver Welch, Mayo 1993, Scientific American, 56-64; Young, 1990, Annu. Rev. Immunol., 8:401-420; Craig, 1993, Science, 260:1902-1903; Gething et al., 1992, Nature, 355: 33-45; and Lindquist et al., 1988, Annu. Rev. Genetics, 22:631-677).

0009 Las proteínas de choque térmico se expresan en todas las células en todas las formas de vida y en una variedad de localizaciones intracelulares, es decir, se expresan en el citosol de los procariotas y en el citosol, núcleos, retículo endoplásmico (RE), mitocondrias, y cloroplastos de las eucariotas. Srivastava, 2002, Annu. Rev. Immunol. 20:395-425. Las HSPs también constituyen el grupo simple más abundante de proteínas dentro de las células. Se expresan en grandes cantidades bajo condiciones normales de choque no térmico, y su expresión puede ser fuertemente inducida a niveles mucho más altos como resultado de un choque térmico u otras formas de estrés.

0010 Proteínas de choque térmico están entre las proteínas más altamente conservadas en existencia. Por ejemplo, DnaK, la Hsp70 de *E. coli* tiene aproximadamente 50% de identidad de secuencia de aminoácidos con proteínas Hsp70 de excoriados (Bardwell et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:848-852). Las familias Hsp60 y Hsp90 también muestran niveles similares de conservación intrafamiliar (Hickey et al., 1989, Mol. Cell. Biol., 9:2615-2626; Jindal, 1989, Mol. Cell. Biol., 9:2279-2283). Además, se ha descubierto que las familias Hsp60, Hsp70 y Hsp90 están compuestas de proteínas que están relacionadas con las proteínas de estrés en secuencia, por ejemplo, con identidad de aminoácidos mayor que 35%, pero cuyos niveles de expresión no son alterados por el estrés.

0011 Estudios sobre respuesta celular al choque térmico y otros estreses fisiológicos revelaron que las HSPs poseen funciones como despliegue y repliegue de proteínas, degradación de proteínas, conjunto de complejos de múltiples subunidades, termotolerancia, tamponamiento de expresión de mutaciones, entre otros. Srivastava, 2002, Annu. Rev. Immunol. 20:395-425. Las HSPs cumplen diferentes tipos de funciones chaperonas. Por ejemplo, miembros de la familia Hsp70, situados en el citoplasma de la célula, el núcleo, las mitocondrias, o retículo endoplásmico (Lindquist et al., 1988, Ann. Rev. Genetics, 22:631-677), están implicados en la presentación de antígenos a las células del sistema inmune, y también están implicados en la transferencia, plegado y ensamblaje de proteínas en la células normales. Las HSPs son capaces de unir proteínas o péptidos, y de liberar las proteínas o péptidos ligados en la presencia de trifosfato de adenosina (ATP) o pH bajo.

2.3 Inmunogenicidad de Complejos HSP-Péptido

0012 Srivastava et al. Demostraron la respuesta inmune a sarcomas inducidos por metilcolantreno de ratones consanguíneos (1988, Immunol. Today, 9:78-83). En estos estudios, se encontró que las moléculas

responsables de la inmunogenicidad individualmente distinta de estos tumores fueron glicoproteínas de 96kDa (gp96) y proteínas intracelulares de 84 a 86kDa (Srivastava et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 83:3407-3411; Ullrich et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 83:3121-3125). La inmunización de ratones con gp96 o p84/86 aisladas de un tumor en particular hizo a los ratones inmunes a ese tumor particular, pero no a tumores antigénicamente distintos. El aislamiento y la caracterización de genes que codifican gp96 y p84/86 revelaron una homología significativa entre ellos, y mostraron que gp96 y p84/86 fueron, respectivamente, las contrapartes endoplásmicas reticular y citosólica de las mismas proteínas de choque térmico (Srivastava et al., 1988, Inmunogenética, 28:205-207; Srivastava et al., 1991, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 167:109-123). Además, se mostró que Hsp70 provoca inmunidad al tumor del que se aisló, pero no a los tumores antigénicamente distintos. Sin embargo, se encontró que Hsp70 empobrecido de péptidos pierde su actividad inmunogénica (Udono y Srivastava, 1993, J. Exp. Med., 178:1391-1396). Estas observaciones sugieren que las proteínas de choque térmico no son inmunogénicas *per se*, sino forman complejos no covalentes con péptidos antigénicos, y los complejos pueden provocar inmunidad específica a los péptidos antigénicos (Srivastava, 1993, Adv. Cancer Res., 62:153-177; Udono et al., 1994, J. Immunol., 152:5398-5403; Suto et al., 1995, Science, 269:1585-1588).

0013 La proteína de choque térmico gp96 chaperona una amplia variedad de péptidos, dependiendo de la fuente de la cual gp96 es aislada (para una revisión, ver Srivastava et al., 1998, Inmunidad, 8:657-665). La gp96 derivada de tumor lleva péptidos antigénicos tumorales (Ishii et al., 1999, J. Immunology, 162:1303-1309.); las preparaciones de gp96 de células infectadas por virus llevan epítomos víricos (Suto y Srivastava, 1995, Science, 269:1585-1588; Nieland et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 95:1800-1805), y las preparaciones de gp96 de células transfectadas con antígenos modelos tales como ovoalbúmina o β -galactosidasa se asocian con los epítomos correspondientes (Arnold et al., 1995, J. Exp. Med., 182:885-889; Breloer et al., 1998, Eur. J. Immunol., 28:1016-1021). La asociación de gp96 con péptidos se produce *in vivo* (Menoret y Srivastava, 1999, Biochem. Biophys. Research Commun., 262:813-818). Complejos gp96-péptido, ya sean aislados de células (Tamura et al., 1997, Science, 278:117-120), o reconstituidos *in vitro* (Blachere et al., 1997, J. Exp. Med., 186:1183-1406) son excelentes inmunógenos y se han utilizado ampliamente para provocar respuestas de células T CD8+ específicas para los péptidos antigénicos acompañados de gp96.

0014 La capacidad de los complejos gp96-péptido para provocar una respuesta inmune es dependiente de la transferencia del péptido a moléculas MHC de clase I de células presentadoras de antígeno (Suto y Srivastava, 1995, *supra*). Antígenos sintetizados de forma endógena acompañados por gp96 en el retículo endoplásmico (RE) pueden cebar antígenos específicos de células T CD8+ (o CTLs restringidos de MHC I) *in vivo*, este cebado de células T CD8+ requiere macrófagos. Aunque los antígenos exógenos suelen ser enviados a través de la vía de presentación MHC II y provocan respuestas CD4+, los complejos gp96-péptido introducidos de manera exógena pueden provocar respuesta de células T CD8+. Suto y Srivastava, 1995, *supra*; Blachere et al., 1997, J. Exp. Med., 186:1315-22.

0015 En vista de la cantidad extremadamente pequeña de péptidos antigénicos acompañados de gp96 necesaria para la inmunización (Blachere et al., 1997, *supra*), y la dependencia estricta de la inmunogenicidad de complejos gp96-péptido en células funcionales presentadoras de antígeno (APCs) (Udono et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 91:3077-3081), se habían propuesto APCs que poseen receptores para gp96 (Srivastava et al., 1994, Inmunogenética, 39:93-98). La propuesta fue confirmada cuando se demostró que el receptor $\alpha 2$ macroglobulina ($\alpha 2$ M) CD91 se une a gp96 y $\alpha 2$ M así como anticuerpos a CD91 inhiben completamente la representación de péptidos acompañados de gp96 por APCs. Binder et al., 2000, Nat. Immunol. 1(2):151-55; Srivastava, 2002, Annu. Rev. Immunol. 20:395-425. Posteriormente, se demostró que CD91 actuaba como el receptor no sólo para gp96, sino también para hsp90, hsp70, y calreticulina. Basu et al., 2001, Inmunidad 14(3):301-13.

0016 Se ha demostrado que los péptidos HSP-acompañados pueden ser re-presentados por las moléculas MHC II de las APCs, además de re-presentados por moléculas MHC I. Srivastava, 2002, Annu. Rev. Immunol. 20:395-425. La re-presentación de moléculas MHC II también se produce a través del receptor CD91. Así, se ha

sugerido que una vez que un complejo HSP-péptido se recoge a través de CD91, puede entrar en una o más vías de tráfico y de procesamiento. Srivastava, *supra*.

0017 Las HSPs también han sido implicadas en la inmunidad innata. La exposición de APCs a gp96 (u otras HSPs) conduce a secreción de niveles bajos de TNF α por las APCs, independientemente de si las moléculas de gp96 se asocian o no con los péptidos antigénicos. Suto y Srivastava, 1995, Science 269:1585-88. Más tarde se demostró que la interacción de HSPs, por ejemplo, gp96, hsp90, hsp 70 y hsp60, con APCs puede conducir a una serie de sucesos relacionados con la inmunidad innata, tales como secreción de citoquinas inflamatorias TNF α , IL-1 β , IL-12, y GM-CSF por macrófagos, secreción de quimiocinas, por ejemplo, MCP-1, MIP-2, y RANTES, por macrófagos, inducción de sintasa inducible de óxido nítrico y producción de óxido nítrico por macrófagos y DCs, maduración de DCs medido por una mayor expresión de MHC II, B7-2 y moléculas CD40 en células CD11c+, migración de gran número de DCs (probablemente células de Langerhans) desde el sitio de inyección de gp96 a los ganglios linfáticos de drenaje, y translocación de NF κ B en los núcleos de macrófagos y DCs. Srivastava, 2002, Annu. Rev. Immunol. 20:395-425. Hay poca evidencia de que CD91 sea el receptor implicado en estos fenómenos, y se ha sugerido que están implicados otros receptores. Ohashi et al., 2000, J. Immunol. 164(2):558-61; Panjwani et al., 2000, Cell Stress Chaperones 5:391; Srivastava, 2002, Annu. Rev. Immunol. 20:395-425.

0018 Pueden usarse complejos no covalentes de HSPs y péptidos, purificados de células cancerosas, para el tratamiento y prevención del cáncer y se han descrito en las publicaciones PCT WO 96/10411, de 11 de abril de 1996, y WO 97/10001, de 20 de marzo de 1997 (Patente U.S. 5,750,119 expedida el 12 de abril 1998, y patente U.S. 5,837,251 expedida el 17 noviembre de 1998, respectivamente). El aislamiento y purificación de complejos proteína de estrés-antígeno se ha descrito, por ejemplo, de células infectadas por el patógeno, y utilizado para el tratamiento y prevención de la infección causada por patógenos, tales como virus y otros patógenos intracelulares, incluyendo bacterias, protozoos, hongos y parásitos (ver, por ejemplo, la publicación PCT WO 95/24923, de 21 de septiembre 1995). También pueden prepararse complejos inmunogénicos proteína-antígeno por complejamiento *in vitro* de proteínas de estrés y péptidos antigénicos, y los usos de tales complejos para el tratamiento y prevención de cáncer y enfermedades infecciosas se ha descrito en la publicación PCT WO 97/10000, de 20 de Marzo 1997 (Patente U.S. 6,030,618 expedida el 29 de febrero 2000).

US-A-6 143 299 describe complejos de proteínas de choque térmico gp96 unidos no covalentemente a una molécula antigénica y el uso de este complejo para inducir una respuesta inmune contra la molécula antigénica y de esta manera tratar o prevenir una enfermedad infecciosa. El uso de complejos proteína de estrés-antígeno para sensibilizar células que presentan antígenos *in vitro* para su uso en inmunoterapia adoptiva se describe en la publicación PCT WO 97/10002, de 20 de marzo de 1997 (ver también la patente U.S. 5,985,270 expedida 16 de noviembre 1999).

0019 La identificación y caracterización de moléculas o métodos específicos que pueden aumentar la inmunogenicidad de antígenos HSP-mediados de péptidos podrían suministrar reactivos y técnicas útiles para provocar inmunidad específica a través de HSP y complejos HSP-péptido, y para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y terapéuticos.

2.4. Lectinas

0020 Las lectinas son un grupo de proteínas que se encuentran en plantas, animales, hongos, algas y bacterias que comparten la propiedad de unirse a grupos carbohidratos específicos (ver Sharon et al., 1972, Science, 177:949). Son una clase de proteínas estructuralmente diversa, y sus características comunes son sólo la capacidad de unir carbohidratos específicamente y reversiblemente, y de aglutinar células mediante la formación de enlaces reticulados entre los grupos oligosacáridos en las superficies celulares. Sharon, 1993, Trends Biochem Sci 18(6):221-6. Las lectinas son ampliamente usadas para fines diagnósticos y experimentales, por ejemplo para identificar células mutantes en cultivos de células, para determinar grupos sanguíneos por activación de aglutinación de glóbulos rojos, o en el mapeo de la superficie de membranas celulares. Las lectinas se utilizan también para la purificación de proteínas debido a su capacidad para unir carbohidratos específicamente y reversiblemente.

0021 Algunas lectinas se pueden agrupar en familias distintas, tales como las de las leguminosas o los cereales que son estructuralmente similares, o lectinas animales del tipo c (Ca^{2+} -dependiente) que contienen dominios de reconocimiento de carbohidratos homólogos. Sharon, *supra*. Las lectinas de leguminosas son sorprendentemente similares en sus estructuras primarias, secundarias y terciarias. Srinivas et al., 2001, Biochem. Biophys. Acta 1527:102-111. Para todas las lectinas de leguminosas conocidas hasta el momento, la estructura terciaria está formada por dos hojas β anti-paralelas, un plano de seis fibras "posterior" y una hoja β curvada de siete fibras "frontal". Srinivas *et al., supra*. Estas hojas están a su vez conectadas para formar un llamado motivo "rollo de gelatina". A pesar de sus similitudes a nivel estructural primario, secundario y terciario, las lectinas de leguminosas muestran diferencias considerables en sus asociaciones cuaternarias y modos de organizaciones de monómeros en el encaje dimérico/tetramérico. Srinivas *et al., supra*.

0022 La concanavalina A (Con A) de haba blanca fue la primera lectina de la familia leguminosas, cuya estructura se conoce. Con A consta de 237 aminoácidos y tiene dos sitios de unión a metales. Becker et al., 1975, J. Biol. Chem. 250: 1513. Con pH 4.5-5.6, Con A existe como un dímero clave. McKenzie et al., 1972, Biochim. Biophys. Acta, 263:283. Por encima de pH 7, es predominantemente tetramérica. Wang et al., 1975, J. Biol. Chem. 250: 1490. Con A reacciona con D-glucosa y D-manosa no reductoras. Smith et al., 1967, Arch. Biochem. Biophys., 121:88. En tales reacciones, α -metil-D-glucopiranosido puede actuar como un inhibidor competitivo. Smith *et al., supra*.

3. RESUMEN DE LA INVENCION

0023 La presente invención proporciona uno o más complejos no covalentes, cada complejo comprendiendo una proteína de choque térmico, una molécula antigénica, y una lectina, en el que dicha proteína de choque térmico está glicosilada, y donde la cantidad de lectina presente en dichos complejos respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es mayor que o igual a 50 nanogramos de lectina por microgramo de proteína de choque térmico o menor que o igual a 5 nanogramos de lectina por microgramo de proteína de choque térmico. Como aquí se usa, el término "Molécula Antigénica" se refiere a una molécula que muestra uno o más determinantes antigénicos contra los que se desea una respuesta inmune en un sujeto (por ejemplo, para fines terapéuticos). Ejemplos no limitantes de Moléculas Antigénicas se dan en la Sección 5.2.

En una realización preferida, la molécula inmunológicamente y/o biológicamente activa es un agente terapéutico. También se proporcionan métodos para fabricar tales composiciones y las composiciones para uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad (por ejemplo, cáncer, una enfermedad infecciosa, anemia, enfermedad de deficiencia de hormona del crecimiento, enfermedad de deficiencia de enzimas, una afección de inmunosupresión) y para uso en la estimulación de una respuesta inmune en un sujeto necesitado. Sin estar ligados por ninguna teoría, la invención se basa, en parte, en el descubrimiento de los solicitantes de que la lectina promueve la oligomerización de glicoproteínas (incluyendo glucopéptidos y glicopolipéptidos) o un complejo inmunológicamente y/o biológicamente activo que comprende uno o más glicoproteínas, y que el complejo oligomerizado muestra mayor actividad biológica (tanto *in vitro* como *in vivo*) que la de las moléculas no-oligomerizadas.

0024 Se describen aquí uno o más complejos moleculares no covalentes o una composición que comprende uno o más complejos moleculares no covalentes, en los que cada complejo molecular comprende una lectina asociada con una glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa, y donde la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de glicoproteína es igual o mayor que 1fg, 100fg, 500fg, 1 μ g, 100 μ g, 500 μ g, 1ng, 2ng, 5ng, 10ng, 20ng, 30ng, 40ng, 50ng, 75ng, 100ng, o 200ng por microgramo de glicoproteína. En una realización específica, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de glicoproteína es 40ng a 1000ng, 50ng a 1000ng, 50ng a 500ng, 50ng a 250ng, o 100ng a 500ng de lectina por microgramo de glicoproteína. En otra realización, la lectina está en exceso molar con respecto a la glicoproteína. En una realización, la glicoproteína es una Molécula Antigénica. En una realización específica, se describe aquí que el complejo molecular comprende una lectina, una glicoproteína que es una Molécula Antigénica, y otra molécula, tal como una proteína de choque térmico ("HSP"), que puede o no estar glicosilada. En otra realización, la glicoproteína no es una Molécula Antigénica. En una realización específica, la glicoproteína es una proteína de choque térmico glicosilada. En otra realización, el complejo molecular

comprende una lectina, una glicoproteína que no es una Molécula Antigénica, y una Molécula Antigénica (que puede o no ser una glicoproteína). En una realización específica, la Molécula Antigénica es una proteína (que incluye péptidos y polipéptidos) que muestra la antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un agente de una enfermedad infecciosa.

5 0025 La presente invención proporciona uno o más complejos moleculares o una composición que comprende uno o más complejos moleculares, cada complejo comprendiendo una proteína de choque térmico, una Molécula Antigénica, y una lectina, en donde la proteína de choque térmico está glicosilada, y donde la cantidad de lectina presente en los complejos respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es igual o superior a 50ng, 75ng, 100ng, o 200ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de
10 lectina presente en los complejos respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es 50ng a 1000ng, 50ng a 500ng, 100ng a 250ng, o 150ng a 200ng de lectina por microgramo de proteína de choque térmico. En algunas realizaciones, la cantidad presente de lectina en los complejos respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es igual o inferior a 5ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de proteína de choque térmico está entre
15 0.1ng a 5ng, 0.2ng a 4ng, 0.3ng a 3ng, 0.5ng a 2ng, o 0.1ng a 1ng de lectina por microgramo de proteína de choque térmico.

0026 Se describe aquí una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y uno o más complejos moleculares, en donde cada complejo molecular comprende una lectina y una glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa, y en donde dicha glicoproteína forma oligómeros en
20 dicho complejo en presencia de lectina. En una realización, la glicoproteína es una Molécula Antigénica. En una realización específica, el complejo molecular comprende una lectina, una glicoproteína que es una Molécula Antigénica, y otra molécula, tal como una proteína de choque térmico ("HSP"), que puede o no estar glicosilada. En otra realización, la glicoproteína no es una Molécula Antigénica. En una realización específica, la glicoproteína es una proteína de choque térmico glicosilada. En otra realización, el complejo molecular
25 comprende una lectina, una glicoproteína que no es una Molécula Antigénica, y una Molécula Antigénica (que puede o no ser una glicoproteína). En una realización preferida, la molécula antigénica es una proteína (que incluye péptidos y polipéptidos) que muestra la antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un agente de una enfermedad infecciosa. En algunas realizaciones, la glicoproteína es una proteína de choque térmico, y la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de proteína de choque
30 térmico es igual o superior a 5ng, 10ng, 20ng, 30ng, 40ng, 50ng, 75ng, 100ng, o 200ng por microgramo de glicoproteína. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es 40ng a 1000ng, 50ng a 1000ng, 50ng a 500ng, 50ng a 250ng, o 100ng a 500ng de lectina por microgramo de HSP. En algunas realizaciones, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es igual o inferior a 5ng por microgramo de HSP.
35 Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de HSP está entre 0.1ng a 5ng, 0.1ng a 4ng, 0.1ng a 3ng, 0.1ng a 2ng, 0.1ng a 1ng, 0.5ng a 5ng, 0.5ng a 3ng, o 1ng a 4ng de lectina por microgramo de glicoproteína. En algunas realizaciones, la glicoproteína no es una proteína de choque térmico, y la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de glicoproteína es
40 igual o mayor que 1fg, 100fg, 500fg, 1µg, 100µg, 500µg, 1ng, 2ng, 5ng, 10ng, 20ng, 30ng, 40ng, 50ng, 75ng, 100ng, o 200ng por microgramo de glicoproteína.

0027 El complejo molecular de la invención comprende una lectina asociada con una proteína de choque térmico glicosilada complejada con una Molécula Antigénica (por ejemplo, una proteína antigénica (que incluye péptido y polipéptido antigénico)). Algunas proteínas de choque térmico están naturalmente glicosiladas, incluyendo, pero no limitadas a, gp96, GRP170, calreticulina, y BIP (GRP78). Las proteínas de choque térmico
45 que no están glicosiladas naturalmente también se pueden convertir en una glicoproteína mediante la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en las secuencias nativas de aminoácidos que comprende la proteína de choque térmico seguida de la adición de grupos de hidratos de carbono, o por ingeniería de HSP para que contenga secuencias de péptidos que se unen a Con A. (ver Scott et al., PNAS (1992) 89:5398-5402), o uniendo covalentemente HSP a Con A utilizando química de acoplamiento conocida en la materia. Se describe aquí que los complejos moleculares comprenden una lectina asociada con una
50

glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa que no es una proteína de choque térmico. En aún algunas otras realizaciones, los complejos moleculares comprenden una lectina asociada con una glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa complejada con una proteína de choque térmico (que puede o no estar glicosilada). En algunas realizaciones, el complejo molecular de la invención es un complejo no covalente. Se describe que el complejo molecular de la invención es un complejo covalente.

0028 En una realización preferida, la lectina en los complejos moleculares de la invención es una lectina fijadora de manosa. En una realización específica, la lectina en los complejos moleculares de la invención es Concanavalina A (Con A). En una realización preferida, la proteína de choque térmico en los complejos moleculares de la invención es gp96. En una realización específica, los complejos moleculares de la invención son purificados.

0029 La presente invención también proporciona métodos para preparar los complejos moleculares de la invención. En alguna realización, se añade lectina después de que una glicoproteína o un complejo de una glicoproteína con otra molécula (por ejemplo, HSP glicosilada asociada con una Molécula Antigénica) se purifica para promover la oligomerización de la glicoproteína. En alguna realización, se añade lectina durante el proceso de purificación de una glicoproteína o un complejo de una glicoproteína con otra molécula (por ejemplo, HSP glicosilada con una Molécula Antigénica) para promover la oligomerización de la glicoproteína. En una realización, la presente invención proporciona un método de preparación de uno o más complejos no covalentes, en el que cada complejo comprende una proteína de choque térmico, una Molécula Antigénica, y una lectina, y en donde dichas proteínas de choque térmico son glicosiladas, dicho método comprendiendo los pasos de; (a) unir dicha lectina a dicha proteína de choque térmico, y (b) complejar dicha proteína de choque térmico a la Molécula Antigénica. En otra realización, la presente invención proporciona un método de preparar uno o más complejos no covalentes, en el que cada complejo comprende una proteína de choque térmico, una Molécula Antigénica, y una lectina, y en el que dicha proteína de choque térmico y/o Molécula Antigénica están glicosiladas, dicho método comprendiendo unir una lectina a uno o más complejos, cada complejo comprendiendo una proteína de choque térmico y una Molécula Antigénica, en donde dicha lectina no está unida a una fase sólida. En una realización específica, el método comprende aislar el complejo de proteína de choque térmico y Molécula Antigénica por cromatografía de afinidad basada en lectina antes de unir el complejo a una lectina. En otra realización específica, el método comprende aislar dicho complejo de proteína de choque térmico y Molécula Antigénica por método de purificación de proteínas no basada en lectinas, tales como cromatografía de afinidad basada en anticuerpos, antes de unir el complejo a una lectina. La invención proporciona además composiciones hechas por los métodos descritos.

0030 Se describe aquí un método para prevenir o tratar una enfermedad (por ejemplo, cáncer, enfermedades infecciosas, anemia, deficiencias de hormona de crecimiento, enfermedades de deficiencia de enzimas, afecciones de inmunosupresión, etc.) que comprende administrar a un sujeto necesitado del mismo una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de una composición que comprende uno o más complejos no covalentes, en donde cada complejo comprende una lectina asociada con una glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa. En una realización, la glicoproteína es una Molécula Antigénica. En una realización específica, el complejo comprende una lectina, una glicoproteína que es una Molécula Antigénica, y otra molécula, tal como una proteína de choque térmico ("HSP"), que puede o no estar glicosilada. En otra realización, la glicoproteína no es una Molécula Antigénica. En una realización específica, la glicoproteína es una proteína de choque térmico glicosilada. En otra realización, el complejo molecular comprende una lectina, una glicoproteína que no es una Molécula Antigénica, y una Molécula Antigénica (que puede o no ser una glicoproteína). En una realización específica, la Molécula Antigénica es una proteína (que incluye péptidos y polipéptidos) que muestra la antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un agente de una enfermedad infecciosa. La composición puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable.

0031 Se describe aquí un método para prevenir o tratar una enfermedad (por ejemplo, cáncer, enfermedades infecciosas, anemia, deficiencias de hormona de crecimiento, enfermedades de deficiencia de enzimas, condiciones de inmunosupresión, etc.) que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello una cantidad

profilácticamente o terapéuticamente eficaz de una composición que comprende uno o más complejos no covalentes, en donde cada complejo comprende una lectina, una proteína de choque térmico, y una Molécula Antigénica, en donde dicha proteína de choque térmico y/o Molécula Antigénica está/están glicosiladas, y donde la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de HSP es igual o superior a 5ng, 10ng, 20ng, 30ng, 40ng, 50ng, 75ng, 100ng, o 200ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de Hsps es 40ng a 1000ng, 50ng a 1000ng, 50ng a 500ng, 50ng a 250ng, o 100ng a 500ng de lectina por microgramo de proteína de choque térmico. En algunas realizaciones, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de Hsp es igual o inferior a 5ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de proteína de choque térmico está entre 0.1ng a 5ng, 0.1ng a 4ng, 0.1ng a 3ng, 0.1ng a 2ng, 0.1ng a 1ng, 0.5ng a 5ng, 0.5ng a 3ng, o 1ng a 4ng de lectina por microgramo de proteína de choque térmico. La composición puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la Molécula Antigénica es una proteína que muestra la antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa.

0032 En una realización preferida, la glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa del complejo molecular, por ejemplo una proteína de choque térmico complejada con un péptido que muestra la antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa, es autóloga al sujeto; es decir, está aislada de las células del propio sujeto (por ejemplo, preparada a partir de biopsias de tumores del paciente cuando se desea tratar el cáncer). Alternativamente, el complejo molecular puede ser alogénico al sujeto al que se administra una composición del complejo molecular de la invención. Alternativamente, el complejo molecular se prepara *in vitro*, por ejemplo, a partir de células cultivadas que expresan una forma recombinante de proteínas de choque térmico.

0033 Están descritos aquí métodos y composiciones para la prevención y tratamiento de enfermedades neoplásicas primarias y metastásicas. En adición a terapia de cáncer, las composiciones de la invención pueden ser usadas para la prevención de una variedad de cánceres, por ejemplo, en sujetos que están predispuestos como resultado de historial familiar o en sujetos con un mayor riesgo al cáncer debido a factores ambientales.

0034 Se describe aquí un método para prevenir o tratar una enfermedad (por ejemplo, cáncer, enfermedades infecciosas, anemia, deficiencias de hormona de crecimiento, enfermedades de deficiencia de enzimas, afecciones de inmunosupresión, etc.) que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de una composición que comprende uno o más complejos moleculares de la invención en combinación con uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los complejos moleculares de la invención. Se describe aquí un método para prevenir o tratar una enfermedad (por ejemplo, cáncer, enfermedades infecciosas, anemia, deficiencias de hormona de crecimiento, enfermedades de deficiencia de enzimas, afecciones de inmunosupresión, etc.) que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de una composición que comprende uno o más complejos moleculares de la invención, y uno o más potenciadores de la respuesta inmune o modificadores de la respuesta biológica, incluyendo pero no limitados a, citoquinas, agonistas o antagonistas de diversos ligandos, receptores y moléculas de transducción de señales, ácidos nucleicos inmunoestimulantes y adyuvantes. De acuerdo con este aspecto, las composiciones de la invención se administran en terapia de combinación con una o más de estos potenciadores de respuesta inmune o modificadores de respuesta biológica. En otra realización, las composiciones de la invención se administran en combinación con radioterapia o uno o más agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer. En otra realización, las composiciones de la invención se administran en combinación con agentes anti-víricos, antibacterianos, anti-fúngicos, antiparasitarios para el tratamiento o prevención de una enfermedad infecciosa.

0035 Se describen aquí métodos de suministro de una o más glicoproteínas o uno o más complejos que comprenden glicoproteínas a un sitio deseable o un tipo de célula deseable en un sujeto, dicho método comprendiendo administrar al sujeto uno o más complejos moleculares, en donde cada complejo molecular

comprende dicha glicoproteína y una lectina. En una realización específica, la glicoproteína es una Molécula Antigénica.

0036 La presente invención proporciona además kits que comprenden una pluralidad de recipientes cada uno comprendiendo una formulación o composición farmacéutica que comprende una dosis de complejos moleculares de la invención suficientes para una sola administración profiláctica o terapéutica. La invención también proporciona kits que comprenden un recipiente que comprende una glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa o un complejo de la misma, y un recipiente que comprende lectina. En una realización específica, la presente invención proporciona un kit que comprende: (a) un primer recipiente que contiene una composición que comprende una población de complejos no covalentes, cada complejo comprendiendo una proteína de choque térmico y una Molécula Antigénica, en donde la proteína de choque térmico y/o Molécula Antigénica están glicosiladas, y (b) un segundo recipiente que contiene lectina purificada. Opcionalmente, pueden incluirse en los kits instrucciones para la formulación del complejo oligomerizado de acuerdo con los métodos de la invención.

0037 Específicos regímenes terapéuticos y composiciones farmacéuticas son también proporcionados por la invención.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

0038 Figura 1. Niveles constantemente elevados de Con A en lotes de complejos gp96-péptido humanos. Homogeneizados de tejido de cuatro muestras independientes de tumores renales humanos (de A a D) se prepararon y procesaron por cromatografía de columna de Con A. El eluato Con A se dividió y la mitad del material se apartó. La muestra restante fue intercambiada en tampón PBS (columna PD-10) y, a continuación ambas muestras además se purificaron en columnas DEAE separadas produciendo dos productos finales homogeneizados en concordancia - uno producido sin intercambio de tampón (sin Bx) entre columnas Con A y DEAE y uno producido con un paso de intercambio tampón (Bx) entre las dos columnas. Un ELISA sensible para detectar Con A se utilizó continuación para determinar la concentración de Con A en estas muestras separadas de complejo gp96-péptido. La gp96 purificada a partir de un homogeneizado común mediante un proceso que incluye el paso de intercambio de tampón tenía niveles más altos de Con A que la muestra gp96 homogenato de concordancia correspondiente producida con la omisión del paso de intercambio de tampón.

0039 Figura 2. Con A está presente en un complejo molecular oligomerizado. Un homogeneizado común de tejido fibrosarcoma murino (Meth A) inducido químicamente se preparó y se procesó por cromatografía en columna de Con A. El eluato de Con A se dividió y la mitad del material se apartó. La muestra restante se intercambió en tampón PBS y luego las dos muestras se purificaron en columnas DEAE separadas produciendo dos productos finales homogeneizado de concordancia - uno producido sin intercambio de tampón (sin Bx) y uno producido con un paso de intercambio de tampón (Bx) entre las columnas Con A y DEAE. Ambas muestras, junto con una muestra de Con A libre (5ug, 50ug/mL) se fraccionaron por SEC en una columna Superdex 200 (superior, media, inferior, respectivamente). Las fracciones recogidas se analizaron para gp96 por SDS-PAGE (fracciones 1 a 8; recuadro) y el contenido de Con A en las fracciones individuales se evaluó por un ELISA directo contra Con A (fracciones 1 a 14; de superposición). Se encontró poco Con A en la preparación de no Bx-gp96 mientras que la gp96 producida con Bx mostró tener Con A en las fracciones 1 a 5. Con A libre eluyó mucho más tarde sugiriendo que la Con A presente en la muestra Bx-gp96 no era libre, sino asociada a una especie de mayor peso molecular.

0040 Figura 3. Con A media un cambio en la posición de elución de gp96. Un homogeneizado común de tejido de fibrosarcoma murino inducido por Meth A fue preparado y elaborado mediante un proceso que incluyó Con A y cromatografía de columna DEAE. La preparación purificada final de gp96 se dividió en dos. A una mitad del material, se añadió Con A exógena a una concentración final de 50ug/mL; se añadió tampón solo a la otra como un control, ambas muestras se incubaron a 37°C durante 2 horas y después se fraccionaron por SEC (Superdex 200). Se analizaron fracciones individuales por SDS-PAGE, y por ELISA específico de gp96- y de Con A-. Se muestran datos analíticos para el material producido sin el paso de intercambio de tampón en el panel izquierdo; aquel al que Con A se añadió a la derecha. En el panel izquierdo el pico de gp96 está en la

fracción 5 y los niveles Con A detectada por ELISA específico son bajos. En el panel de la derecha (Con A añadido) dos picos de gp96 son evidentes como se muestra por SDS-PAGE (recuadro; fracciones de pico 3 (flecha) y 5) y ELISA de gp96 (fracciones 3 y 5) así como un pico claro de Con A centrado en la fracción 3. Con A medió un cambio en la posición de elución de gp96.

5 0041 Figura 4. El contenido de Con A se correlaciona con la potencia *in vitro* para muestras de gp96 humanas. Las muestras de gp96 de cuatro muestras independientes de tumores renales humanos (A a D) se prepararon como se describió anteriormente (ver la Fig. 1) generando cuatro pares de muestras que sólo difieren en la inclusión u omisión de un paso de intercambio de tampón entre columnas de Con A y DEAE. Todas las ocho muestras se analizaron para el contenido de Con A (panel A; ver también Fig. 1) junto con la representación de antígeno *in vitro* utilizando el sistema CD71 (panel B). En cada caso, el material preparado por el proceso que incluye el paso de intercambio de tampón (y que contiene niveles elevados de Con A) tuvo una mayor actividad de representación *in vitro* que una muestra generada a partir del homogeneizado de tumor correspondiente y preparada por un paso en el que la etapa de intercambio de *tampón se omitió*.

15 0042 Figura 5. Con A se correlaciona con la potencia *in vitro* en el sistema murino CT26. Las muestras de gp96 de dos muestras independientes de tumores CT26 murinos (Preps A y B) se prepararon como se describe anteriormente para muestras derivadas de tumores humanos (ver Fig. 1) Las cuatro muestras se analizaron para el contenido de Con A (Panel A) y la representación de antígeno *in vitro* utilizando el sistema CT26 (Panel B). En cada caso, el material preparado por el proceso que incluye el paso de intercambio de tampón (y con una mayor cantidad de Con A) tenían mayor actividad de representación *in vitro* que una muestra generada a partir del homogenato de tumor emparejado y preparado por un paso en el que el paso de intercambio de tampón se omitió.

25 0043 Figura 6. Con A se correlaciona con el modelo de protección del tumor Meth A murino tanto en el ensayo *in vitro* de representación Meth A como la potencia *in vivo*. Dos preparaciones Meth A gp96 separadas se prepararon a partir de un homogenato común de tumor (descrito anteriormente en la Figura 1) generando una muestra emparejada que difiere sólo en la inclusión u omisión de un paso de intercambio de tampón entre columnas Con A y DEAE. Estas muestras se analizaron por ELISA Con A para contenido de Con A (Panel A), actividad *in vitro* en el ensayo de representación Meth A (Panel B) e *in vivo* en el ensayo de protección del tumor Meth A en una dosis de 10µg (Panel C). Meth A gp96 preparado por un proceso que incluye un paso de intercambio de tampón entre columnas Con A y DEAE había aumentado el contenido de Con A, mayor en la representación de antígeno *in vitro* y mayor en la actividad de protección del tumor *in vivo* respecto a la preparada por un proceso en el que el paso de intercambio de tampón se omitió.

35 0044 Figura 7. Con A exógena aumenta la actividad de gp96 en el ensayo de representación de CD71 *in vitro*. El tejido hepático humano se homogeneizó y se centrifugó produciendo un sobrenadante 11K que se dividió en 3 muestras idénticas y procesó por diferentes métodos. Dos lotes fueron procesados a través de cromatografía en columna de Con A, el eluato de Con A se dividió y se apartó la mitad del material. La muestra restante se intercambió a tampón PBS y luego las dos muestras se purificaron en columnas DEAE separadas produciendo dos productos finales de homogenato emparejado - uno producido sin intercambio de tampón (NO Bx - muestra A) y uno producido con un paso de intercambio de tampón (Bx - muestra B) entre las columnas Con A y DEAE. La gp96 del sobrenadante 11K restante fue purificada utilizando una columna scFv gp96-específica como se ha descrito (Arnold-Schild et al., Cancer Research, 2000, 60(15):4175-4178) y el eluato se concentró produciendo la muestra D. Todas las muestras se analizaron para la concentración de Con A por un ELISA específico de Con A y para la representación de antígeno *in vitro* a una concentración de proteína en el sistema CD71 de 75µg/mL. Para pares de muestras emparejadas, el material producido por el proceso que incluye el paso de intercambio de tampón (Muestra # 1; contenido Con A 7.5ng/µg de proteína total) era más activo *in vitro* que el material producido por un proceso en el que el paso de intercambio de tampón se omitió (muestra A; contenido Con A 0.43ng/µg de proteína total). El material producido por un método de un solo paso que no utilizó un paso de purificación en columna de Con A (scFv gp96; 0 ng / µg) tenía baja actividad *in vitro* similar a la muestra A. La adición de Con A exógena a las muestras A y C a niveles equivalentes a los de la muestra B (7.5ng Con

A/ μ g proteína total), aumentó la actividad específica de representación de antígeno *in vitro* a un nivel similar al presente en la muestra B. Este nivel de Con A no tuvo ningún efecto sobre las células T solas.

0045 Figura 8. La especie oligomérica es sensible a metil α -D-manopiranosido (α -MM). Una muestra de meth A gp96 fue purificada por el proceso de purificación estándar que incluye cromatografía de Con A y DEAE (sin intercambio de tampón) y la proteína analizada por SEC analítico utilizando una columna Superose 6 (Pharmacia) que mostró que la preparación de proteína contenía principalmente gp96 dimérica (gp96 T=0). Con A fue añadida (50 μ g/mL final) a una alícuota de esta muestra de gp96 (concentración 500 μ g/mL), la muestra se incubó a temperatura ambiente y se tomaron muestras cada hora (T=1 a T=5) y se analizaron por SEC. Una muestra que comprende Con A sola también se ejecutó. La adición de Con A medio un cambio en la posición de elución del pico de gp96 dímero que cambió sólo ligeramente tras el primer punto de tiempo. La gp96 sola no cambió durante este período de tiempo (gp96, T=5). Después del punto final de tiempo, se tomaron dos alícuotas separadas de la muestra final de 5 horas y o bien un volumen igual de PBS o se añadió PBS conteniendo un 10% α -MM. Cada muestra fue luego re-analizada por SEC. Ningún cambio fue evidente en la muestra a la que se añadió PBS (no mostrado). La adición de α -MM disoció el complejo de alto peso molecular (gp96 +con A T=5 + α -MM) dando lugar al perfil SEC que se asemeja al de la muestra gp96 original (gp96 T=0 o T=5).

0046 Figura 9. Bajas estequiometrías de Con A:gp96 median un cambio sensible a SEC en la posición de elución de gp96. El gp96 de tumor renal humano se purificó por el procedimiento de purificación estándar que incluye cromatografía de Con A y DEAE y la proteína se analizó por SEC analítico utilizando una columna Superose 6 (Pharmacia). Se añadió Con A en una concentración final de 0,005 - 50 μ g/mL a gp96 (180 μ g/mL), la muestra se incubó a temperatura ambiente durante una hora y se analizó por SEC. Estequiometrías de ~ 1 Con A : 10 gp96 son capaces de generar un cambio sensible a SEC en la posición de elución de gp96.

0047 Figura 10. La adición de metil- α D-manopiranosido provoca una disminución dependiente de concentración en la actividad de representación de antígeno *in vitro* de CT26. Una muestra de gp96 derivada de CT26 (preparada por el proceso Bx) junto con un péptido 9-mero de control positivo (SPSYVYHQF) se incubaron durante 30 minutos en presencia de 50, 100 o 400 mM α -MM antes de ser diluidos (1 en 5) en un pocillo de placa de microtitulación que contiene células RAW264.7 de APC y células T específicas de AH1. Las muestras se incubaron durante la noche y los sobrenadantes resultantes se analizaron mediante un ELISA específico de INF- γ . α -MM causó una disminución dependiente de la dosis en la representación de antígeno CT26 y no tuvo efecto sobre el reconocimiento de células T del péptido 9-mero de control positivo.

0048 Figura 11. La adición de Con A durante la purificación del péptido Hsp provoca un aumento valorable en la actividad de rechazo del tumor de HSPPC-96.

0049 Figura 12. Can A aumenta la actividad de rechazo del tumor de gp96. (A) Con A añadido durante la purificación del péptido Hsp. (B) Con A añadido al producto final.

0050 Figura 13. Con A aumenta la actividad de rechazo del tumor de HSPPC-96 que se purificó por columna de inmunoadfinidad.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

0051 La presente invención proporciona uno o más complejos no covalentes, cada complejo comprendiendo una proteína de choque térmico, una molécula antigénica, y una lectina, en donde dicha proteína de choque térmico está glicosilada, y donde la cantidad de lectina presente en dichos complejos respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es mayor que o igual a 50 nanogramos de lectina por microgramo de proteína de choque térmico o menor que o igual a 5 nanogramos de lectina por microgramo de proteína de choque térmico.

0052 Como será evidente para un experto en la materia "una" lectina, "una" glicoproteína, o "una" otra molécula cualquiera, cuando se utiliza en el contexto de un complejo (es decir, como un componente de un complejo), se refiere a "al menos una" lectina, "al menos una" glicoproteína, o "al menos una" otra molécula cualquiera, respectivamente, a menos que expresamente se indique lo contrario. También se proporcionan métodos de

preparar los complejos moleculares, y los complejos moleculares o composiciones que comprenden tales complejos moleculares para uso en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades (por ejemplo, cáncer, enfermedades infecciosas, anemia, deficiencias de hormona de crecimiento, enfermedades de deficiencia de enzimas, afecciones de inmunosupresión, etc.) y para uso en provocar una respuesta inmune en un sujeto necesitado de ello. La invención es útil en diversas situaciones, incluyendo pero no limitado a, donde es deseable para modular la potencia biológica de una molécula inmunoterapéutica y/o biológicamente activa; para mejorar el suministro de vacuna en células presentadoras de antígeno por el receptor específico y/o alternativo o sucesos no mediados por receptor; para mejorar el suministro de una fracción inmunoterapéutica y/o biológicamente activa a un objetivo de interés; para mejorar las capacidades adyuvantes de una fracción inmunoterapéutica; o para capturar fracciones secundarias inmunoterapéuticas/inmunoactivas y suministrarlas a una célula presentadora de antígeno por absorción específica mediada por receptor.

0053 Como se usa aquí, a menos que se indique lo contrario, los términos "molécula", "complejo", "complejo molecular", "glicoproteína", "glicopéptido", "proteínas de choque térmico", "proteína de choque térmico glicosilada", y "lectina" cuando se usan en singular, también abarcan una pluralidad de las moléculas, y puede referirse a una población de las moléculas mencionadas.

0054 Como se utiliza aquí, a menos que se indique lo contrario, el término "glicoproteína" se refiere a una molécula que comprende una proteína y uno o más fracciones de carbohidrato. Una glicoproteína puede ser o una glicoproteína de origen natural, o formada por un proceso sintético de glicosilación, es decir, el proceso en el que un carbohidrato se une a la molécula de proteína. Una glicoproteína puede ser o un glucopéptido o un glicopolipéptido. Ejemplos no limitantes de glicoproteínas de origen natural que incluyen, pero no se limitan a, hormonas de crecimiento humano, eritropoyetina (EPO), anticuerpos, activador del plasminógeno tisular (tPA), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y glucocerebrosidasa (Cerezyme™ de Genzyme). En una realización preferida, una glicoproteína es una proteína de choque térmico. En otra realización preferida, una glicoproteína es una proteína de choque térmico inmunoactiva. Como aquí se usa, "proteína de choque térmico inmunoactiva" se refiere a proteínas de choque térmico que tienen capacidad para modular, preferiblemente mejorar, una respuesta inmune, preferiblemente una respuesta inmune dirigida contra una Molécula Antigénica a la que la proteína de choque térmico está complejada. Tal como aquí se usa, el término "Molécula Antigénica" se refiere a una molécula que muestra uno o más determinantes antígenicos contra los que se desea una respuesta inmune en un sujeto (por ejemplo, para fines terapéuticos). Ejemplos no limitantes de Moléculas Antigénicas se dan en la Sección 5.2. En una realización preferida, una glicoproteína es una proteína de choque térmico glicosilada incluyendo, pero no limitado a, gp96, GRP170, Calreticulina, y BIP (GRP78). Preferiblemente, la proteína de choque térmico glicosilada es gp96. En ciertas realizaciones, una glicoproteína también puede ser una Molécula Antigénica, que puede ser una glicoproteína de origen natural o una Molécula Antigénica que está diseñada para ser una glicoproteína. Ejemplos no limitantes de Moléculas Antigénicas se describen en la Sección 5.2. En ciertas realizaciones, el complejo molecular de la invención comprende una lectina y una glicoproteína que no está desnaturalizada.

0055 Una proteína (que incluye péptido y polipéptido) puede ser genéticamente modificada a una glicoproteína añadiendo uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia aminoácida nativa y que expresan de forma recombinante la proteína en una célula huésped que puede glicosilar proteínas. La glicosilación de una proteína es normalmente N-ligada u O-ligada. El término "N-ligada" se refiere a la unión de la fracción carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la fracción carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. El término "glicosilación O-ligada" se refiere a la unión de uno de los azúcares tales como N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un ácido hidroxilamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

- 0056 La adición de sitios de glicosilación puede conseguirse por diversos medios. Por ejemplo, la secuencia aminoácida de una proteína o péptido de interés puede alterarse de modo que contenga una o más secuencias del tripéptido anteriormente descrito (para sitios de glicosilación N-ligados). La alteración también puede hacerse mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia nativa (para los sitios de glicosilación O-ligados). La secuencia de aminoácidos opcionalmente puede ser alterada por cambios en el nivel del ADN, en particular mediante la mutación del ADN que codifica una proteína de interés en bases pre-seleccionadas de tal manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados. La mutación(es) del ADN puede hacerse, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en la Patente EE.UU. No. 5,364,934.
- 0057 Otro medio de aumentar el número de fracciones carbohidrato en una proteína (incluyendo péptido y polipéptido) es por acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a la proteína. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar(es) puede estar unido a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres, tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina, triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Cualquier método conocido en la técnica, tal como los métodos descritos en la Publicación Internacional No. WO 87/05330, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981), se puede utilizar. Una vez que uno o más hidratos de carbono se añaden a una proteína, la lectina puede formar un complejo con la proteína uniéndose a las unidades de carbohidratos.
- 0058 En algunas realizaciones de la invención, la glicoproteína muestra la antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa. En algunas otras realizaciones de la invención, la glicoproteína no muestra la antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa. En algunas realizaciones, la glicoproteína es una proteína de choque térmico, y la proteína que acompaña la proteína de choque térmico (*in vivo*) o complejada con muestra la antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa.
- 0059 Como aquí se usa, el término "antigenicidad" se refiere a la capacidad de una molécula para unir moléculas de anticuerpo o de MHC. Como aquí se usa, "un tipo de cáncer" se refiere al tipo de células del tejido de origen, por ejemplo, de mama, pulmón, ovario. En una realización, la Molécula Antigénica muestra la antigenicidad de un antígeno de un agente infeccioso. En otra realización, la Molécula Antigénica muestra la antigenicidad de un antígeno sobreexpresado en una célula de cáncer con respecto a su expresión en una célula no cancerosa de dicho tipo de células. En otra realización, la Molécula Antigénica es un antígeno específico del tumor o un antígeno asociado al tumor. En otra realización, el complejo molecular se purifica. En otra realización, el complejo molecular purificado comprende lectina asociada con una proteína de choque térmico y una Molécula Antigénica de un agente infeccioso o un antígeno sobreexpresado en una célula de cáncer con respecto a su expresión en una célula no cancerosa de dicho tipo de células.
- 0060 Muchas lectinas son conocidas en la materia. El término "lectina" se refiere a un grupo de proteínas que comparten la propiedad de unirse a grupos carbohidrato específicos. Una lectina puede ser purificada a partir de una fuente natural, tal como de plantas, animales, hongos, algas y bacterias, o puede ser sintetizada químicamente. En ciertas realizaciones, las lectinas se reticulan entre sí por cualquier método conocido en la materia para formar un dímero u oligómero para uso en la presente invención. En una realización preferida, la molécula de lectina es una lectina de unión a manosa, que puede ser, pero no se limita a, las que figuran en la Tabla 1. Las lectinas están disponibles en el mercado de muchos proveedores comerciales, tales como Sigma (ver el sitio web de Sigma sigmaaldrich.com/Brands/Sigma/Enzyme_Explorer_Home/Lectin_for_life_Science_html). En una realización preferida, la lectina es Concanavalina A (Con A).

Tabla 1. Ejemplos de Lectinas

Sigma Producto Nº.:	LECTINA	Mol. p. (kDa):	Sub- unidades	Especificidad Grupo Sanguíneo:	Especif. Azúcar:	Actividad mitogénica
L 5640	Agaricus bisporus	58.5	-	-	β -gal(1->3) galNac	
L 4141	Anguilla anguilla	40	2	H	α -L-Fuc	
L 0881	Arachis hypogaea	120	4	T	β -gal(1->3) galNac	
L 7759	conjugado					
L 6135	conjugado					
L 7381	conjugado					
L 3766	conjugado					
L 6646	conjugado					
L 3515	Artocarpus integrifolia	42	4	T	α -gsl->OMe	(+)
L 4650	conjugado					
L 5147	conjugado					
Bandeiraea Simplicifolia						
L 2380	BS-I	114	4	A, B	α -gal, α -galNAc	
L 3759	conjugado					
L 9381	conjugado					
L 5264	conjugado					
L 1509	BS-I-A4	114	4	A	α -galNAc	
L 0890	conjugado					
L 3019	BS-I-B4	114	4	B	α -gal	
L 5391	conjugado					
L 2140	conjugado					
L 2895	conjugado					

L 6013	Bauhinia purpurea	195	4	-	β -gal(1->3) galNAc	(+)
L 9637	Caragena arborescens	60;120 (c)	2;4	-	galNAc	
Bandeiraea Simplicifolia						
L 3141	Cicer arietinum	44	2	-	fetuin	
L 2638	Codium fragile	60	4	-	galNAc	
L 7275	Concanavalina A	120	4	-	α -man, α -glc	(+)
L 6397	conjugado					
C 2272	conjugado					
C 7642	conjugado					
C 6904	conjugado					
C 9017	conjugado					
L 5021	conjugado					
L 3642	conjugado					
C 7898	conjugado					
L 3885	Succinil-Concanavalina A	51	2	-	α -man, α -glc	(+) (d)
L 9385	conjugado					
L 2766	Datura stramonium	86	2a&B)a	-	(glcNAc) ₂	
L 2785	Dolichos biflorus	140	4	A1	α -galNAc	
L 1287	conjugado					
L 6533	conjugado					
L 9142	conjugado					
L 9658	conjugado					
L 9894	conjugado					
L 2142	Erythrina	60	2	-	β -gal(1->4)	(+)

	corallodendron				glcNAc	
L 5390	Erythrina cristagalli	56.8	2(a&B)a	-	β -gal(1->4) glcNAc	
L 7400	Euonymus europaeus	166	4(a&B)a	B, H	α -gal(1->3) gal	(+)
L 8725	Galanthus nivalis	52	4	(h)	Non-reduc. D-man	
L 8775	conjugado					
L 1395	Glycine max	110	4	-	galNAc	(+) (b)
L 2650	conjugado					
L 4511	conjugado					
L 1105	conjugado					
L 6635	Helix aspersa	79	-	A	galNAc	
L 8764	conjugado					
L 3382	Helix promotia	79	6	A	galNAc	
L 6387	conjugado					
Bandeiraea Simplicifolia						
L 6512	conjugado					
L 1034	conjugado					
L 1261	conjugado					
L 9267	Lens culinaris	49	2	-	α -man	(+)
L 4143	conjugado					
L 9262	conjugado					
L 0511	conjugado					
L 2263	Limulus polyphemus	400	18	-	NeuNAc	
L 2886	Lycopersicon	71	-	-	(glcNAc)3	(+) (e)

	esculentum					
L 0651	conjugado					
L 0401	conjugado					
L 8025	Maackia amurensis	130	2(a&B)	O	ácido siálico	(+)
L 6141	Maclura pomifera	40-43	2(a&B)a	-	α -gal, α -galNAc	
L 4401	conjugado					
L 2013	conjugado					
L 5650	Narcissus pseudonarcissus	26	2	(h)	α -D-man	
L 3138	Phaseolus coccineus	112	4	-	-	
L 4389	conjugado					
Phaseolus Vulgaris						
L 8629	PHA-E	128	4	-	oligosacárido	(+)
L 6139	conjugado					
L 2769	PHA-L	126	4	-	oligosacárido	(+)
L 8754	PHA-P					
L 2646	PHA-M					
L 9379	Phytolacca americana	32f	-	-	(glcNAc) ₃	(+)
L 2882	conjugado					
L 5380	Pisum sativum	49	4(a&B)a	-	α -man	(+)
L 0770	conjugado					
L 9895	Pseudomonas aeruginosa (PA-1)	13-13.7	-	-	gal	
L 2138	Psophocarpus tetragonolobus	35	1	-	-galNAc, gal galNAc, gal	

	bus					
Phaseolus Vulgaris						
L 3109	conjugado					
L 3014	conjugado					
L 3264	conjugado					
Ricinus Communis						
L 7886	Agglutinin, RCA ₁₂₀	120	4	-	β-gal	
L 2390	conjugado					
L 2758	conjugado					
L 9514	Ricina, cadena A					
L 4022	Ricina, cadena A, desglicosila					
L 9639	Ricina, cadena B					
L 6890	Sambucus nigra					
L 4266	Solanum tuberosum					
L 9254	Tetragonol o-bus purpureas	120(A),58 (B), 117(C)	4;2;4	H	α -L-fuc	
L 5759	conjugado					
L 3134	conjugado					
L 5644	conjugado					
L 9640	Triticum vulgaris	36	2	-	(glcNAc) ₂ , NeuNAc	(+)
L 3892	conjugado					
L 0390	conjugado					
L 5142	conjugado					
L 4895	conjugado					

L 9884	conjugado					
L 1894	conjugado					
L 1882	conjugado					
Ulex Europaeus						
L 5505	UEA	68	-	H	α -L-fuc	
L 8146	conjugado					
L 8262	conjugado					
L 9006	conjugado					
L 4889	conjugado					
L 6263	Vicia faba	50	4(a&B)a	-	man, glc	(+)
L 4011	Vicia villosa	139	4a	A ₁ +T _n	galNAc	
Ulex Europaeus						
L 9388	conjugado					
L 7513	Isolectina B4	143	4	Tn	galNAc	
L 7888	conjugado					
L 2662	Viscum album	115g	4(a&B)a	-	β -gal	
	Wisteria floribunda	68	2	-	galNAc	
L 1516	conjugado					
L 2016	Reducido	34	1	-	galNAc	
L 1766	conjugado					

0061 Se divulgan aquí complejos que comprenden una lectina y una glicoproteína (que puede o no ser una Molécula Antigénica), y complejos moleculares que comprenden una lectina, una glicoproteína, y también una molécula (por ejemplo, una Molécula Antigénica) que no es una glicoproteína. Cada complejo molecular de la invención puede comprender una o más moléculas de una glicoproteína, una o más moléculas de una lectina, y una o más Moléculas Antigénicas si están presentes en el complejo. Preferiblemente, el complejo comprende más de una molécula de glicoproteína que forma oligómeros en presencia de lectina. Cuando los complejos moleculares comprenden más de una glicoproteína, las glicoproteínas no necesitan ser homogéneas, es decir, algunas de las glicoproteínas de la población son Moléculas Antigénicas, y algunas de las glicoproteínas no son Moléculas Antigénicas. La estequiometría de los componentes de un complejo molecular de la invención puede ser representada por las proporciones (g): (l): (a) donde (g), (l), y (a) pueden ser cualquier número entero y (g) es el número de moléculas de glicoproteína (que puede o no ser una Molécula Antigénica) en el complejo, (l) es el número de moléculas de lectina en el complejo, y (a) es el número de otras moléculas (por ejemplo,

Moléculas Antígenicas que no sean glicoproteínas) en el complejo. En los complejos donde no hay otras moléculas (por ejemplo, no hay Moléculas Antígenicas que no sean glicoproteínas), $a = 0$. Por ejemplo, un complejo molecular puede comprender una glicoproteína (que puede o no ser una Molécula Antígenica) y una lectina. En otro ejemplo, un complejo molecular puede comprender una lectina, dos proteínas de choque térmico, y dos Moléculas Antígenicas. Hay muchas combinaciones más que están comprendidas por la presente invención. En una realización preferida, l es mayor que g , es decir, el número de lectinas presentes en un complejo molecular es más que el número de glicoproteínas que están presentes en el complejo molecular. En algunas realizaciones, la relación molar entre glicoproteína y lectina es 3:1, 2:1, o 1:1. En una realización preferida, la lectina es Con A en forma de un tetrámero, y para cada molécula de Con A tetrámero, hay tres, dos, o una glicoproteína(s) unida.

0062 Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona una población homogénea de complejos en los que las relaciones estequiométricas de $(g) : (l) : (a)$ para todos los complejos son idénticas o aproximadamente la misma. En otra realización, la invención proporciona una población de complejos en la que los complejos muestran más de una relación de $(g) : (l) : (a)$ o las proporciones no son conocidas para todos los complejos en la población, es decir, la estequiometría de los componentes de un complejo molecular de la invención puede variar entre los complejos moleculares en una población. En realizaciones de la invención en las que las relaciones estequiométricas de un complejo o una población de complejos no han sido determinadas, las relaciones de masa de cada componente se pueden utilizar en la mayoría de los casos para caracterizar el complejo o la población de complejos. Por ejemplo, una población de complejos se puede caracterizar y distinguirse así de otras poblaciones por las cantidades relativas de lectinas y glicoproteínas (incluyendo las proteínas de choque térmico). Ejemplos de tales complejos y métodos para la determinación de las relaciones de masa se proporcionan en la Sección 5.4 más adelante. En algunas realizaciones, se prefiere un complejo que comprende una proteína de choque térmico, una lectina y una Molécula Antígenica, donde la cantidad de lectina respecto a la proteína de choque térmico es mayor que o igual a 50ng, 75ng, 100ng, o 200ng por microgramo de proteína de choque térmico. En otras realizaciones, se prefiere un complejo que comprende una proteína de choque térmico, una lectina y una Molécula Antígenica, donde la cantidad de lectina respecto a la proteína de choque térmico es menor que o igual a 5ng, 4ng, 3ng, 2ng, o 1ng.

0063 En una realización preferida, un complejo molecular comprende una lectina, una proteína de choque térmico glicosilada, y una proteína que muestra la antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa. El complejo molecular comprende una lectina y una glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa, en donde dicha glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa puede ser, pero no se limita a, hormonas de crecimiento humanas, eritropoyetina (EPO), anticuerpos terapéuticos, activador tisular del plasminógeno (tPA), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y Cerezyme™ (Genzyme). En otra realización preferida, el complejo molecular comprende una lectina y una glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa, en donde dicha glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa es una Molécula Antígenica.

0064 Se divulgan aquí uno o más complejos moleculares, cada complejo comprendiendo una lectina y una glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa, en el que la lectina forma oligómeros con la glicoproteína, y donde la cantidad de lectina presente en el complejo respecto a la cantidad de glicoproteína es igual o mayor que 1fg, 100fg, 500fg, 1µg, 100µg, 500µg, 1ng, 2ng, 5ng, 10ng, 20ng, 30ng, 40ng, 50ng, 75ng, 100ng, o 200ng por microgramo de glicoproteína. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en el complejo respecto a la cantidad de glicoproteína es 40ng a 1000ng, 50ng a 1000ng, 50ng a 500ng, 100ng a 250ng, o 150ng a 200ng de lectina por microgramo de glicoproteína. En algunas realizaciones, la cantidad de lectina presente en el complejo respecto a la cantidad de glicoproteína es igual o inferior a 5ng por microgramo de glicoproteína. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en el complejo respecto a la cantidad de glicoproteína es entre 0.1ng a 5ng, 0.2ng a 4ng, 0.3ng a 3ng, 0.5ng a 2ng, o 0.1ng a 1 ng de lectina por microgramo de glicoproteína. El complejo molecular puede comprender además una o más de otras moléculas, preferentemente proteínas (que incluye péptidos y polipéptidos), que muestran la antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa. En algunas realizaciones, la

glicoproteína es una proteína de choque térmico. En algunas realizaciones, la glicoproteína no es una proteína de choque térmico. En algunas realizaciones, la glicoproteína es una Molécula Antigénica. En algunas realizaciones, la glicoproteína no es una Molécula Antigénica.

0065 La presente invención proporciona uno o más complejos moleculares, cada complejo comprendiendo una proteína de choque térmico, una Molécula Antigénica, y una lectina, donde la cantidad de lectina presente en el complejo respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es igual o superior a 50ng, 75ng, 100ng o 200ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en el complejo respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es 50ng a 1000ng, 50ng a 500ng, 100ng a 250ng, o 150ng a 200ng de lectina por microgramo de proteína de choque térmico. En algunas realizaciones, la cantidad de lectina presente en el complejo respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es igual o inferior a 5ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en el complejo respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es entre 0.1ng a 5ng, 0.2ng a 4ng, 0.3ng a 3ng, 0.5ng a 2ng, o 0.1ng a 1ng de lectina por microgramo de proteína de choque térmico.

0066 Se describe aquí una composición farmacéutica que comprende uno o más complejos moleculares y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde cada complejo molecular es un complejo no covalente que comprende una lectina y una glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa. En algunas realizaciones, la glicoproteína es una proteína de choque térmico, y la cantidad de lectina presente en el complejo respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es igual o superior a 5ng, 10ng, 20ng, 30ng, 40ng, 50ng, 75ng, 100ng, o de 200ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en el complejo respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es 40ng a 1000ng, 50ng a 1000ng, 50ng a 500ng, 100ng a 250ng, o 150ng a 200ng de lectina por microgramo de proteína de choque térmico. En algunas realizaciones, la cantidad de lectina presente en el complejo respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es igual o inferior a 5ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en el complejo respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es de entre 0.1ng a 5ng, 0.2ng a 4ng, 0.3ng a 3ng, 0.5ng a 2ng, o 0.1ng a 1ng de lectina por microgramo de proteína de choque térmico. El complejo molecular puede comprender además uno o más moléculas, preferiblemente proteínas que muestran antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa.

0067 Se describe aquí una población purificada de complejos moleculares en la que cada complejo comprende una glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa y una lectina. En algunas realizaciones, la glicoproteína es una proteína de choque térmico, y la cantidad de lectina presente en la población respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es igual o superior a 5ng, 10ng, 20ng, 30ng, 40ng, 50ng, 75ng, 100ng, o de 200ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en la población respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es 40ng a 1000ng, 50ng a 1000ng, 50ng a 500ng, 100ng a 250ng, o 150ng a 200ng de lectina por microgramo de proteína de choque térmico. En algunas realizaciones, la cantidad de lectina presente en la población respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es igual o inferior a 5ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en la población respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es de entre 0.1ng a 5ng, 0.2ng a 4ng, 0.3ng a 3ng, 0.5ng a 2ng, o 0.1ng a 1ng de lectina por microgramo de proteína de choque térmico. El complejo molecular puede comprender además una o más moléculas, por ejemplo, proteínas (que incluyen péptidos y polipéptidos), que muestran antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa. En una realización, los complejos moleculares de la población comprenden la misma Molécula Antigénica. En otra realización, los complejos moleculares de la población comprenden una Molécula Antigénica diferente. También se proporciona por la invención una población purificada de complejos moleculares que comprenden lectina asociada con un complejo purificado de una célula recombinante en la que cada complejo comprende una glicoproteína asociada a una proteína que muestra antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa.

0068 La presente invención también proporciona métodos para preparar una composición, que es preferiblemente inmunogénica contra una enfermedad (por ejemplo, contra un tipo de cáncer o un agente de enfermedad infecciosa), que comprende un paso de añadir moléculas de lectina para promover la oligomerización de un complejo molecular, en el que dicho complejo molecular es preparado por un método descrito en la sección 5.1-5.4 de la solicitud o un método conocido en la materia. En una realización, el complejo molecular oligomerizado comprende una lectina y una glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa (que puede o no ser una Molécula Antigénica). En otra realización, el complejo molecular oligomerizado comprende una lectina, una glicoproteína, y una Molécula Antigénica, en donde dicha Molécula Antigénica muestra la antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa. En otra realización, el complejo molecular oligomerizado comprende una lectina, una proteína de choque térmico, y una glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa. En otra realización, el complejo molecular comprende una lectina, una proteína de choque térmico glicosilada, y una Molécula Antigénica, y en donde dicha Molécula Antigénica muestra la antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa. La invención proporciona además composiciones formuladas por los métodos descritos.

0069 En una realización, los pasos de preparación de la glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa o un complejo que comprende una glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa asociado con uno o más de otras moléculas que no son lectinas no implican el uso de lectinas, tales como lectinas ligadas a una fase sólida, normalmente usadas en cromatografía en columna. Se añade lectina a la preparación de la glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa o a la preparación del complejo para promover la oligomerización de las glicoproteínas. En otra realización, la adición de lectina es uno de los pasos o parte de un paso en la preparación de la glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa (o glicoproteína asociada con una o más de otras moléculas que no son lectina), donde la cantidad de lectina añadida es suficiente para promover la oligomerización de la preparación, y para producir un producto o productos finales. En algunas realizaciones, el complejo molecular comprende una proteína de choque térmico y una lectina, y la lectina se añade de modo que la cantidad de lectina presente en el producto final(es) respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es igual o superior a 5ng, 10ng, 20ng, 30ng, 40ng, 50ng, 75ng, 100ng, o 200ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en el producto final(es) respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es 40ng a 1000ng, 50ng a 1000ng, 50ng a 500ng, 100ng a 250ng, o 150ng a 200ng de lectina por microgramo de proteína de choque térmico. En algunas realizaciones, la cantidad de lectina añadida es suficiente para promover la oligomerización de la preparación y para producir un producto o productos finales donde la cantidad de lectina presente en el producto final(es) respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es igual o menor de 5ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en el producto final(es) respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es de entre 0.1ng a 5ng, 0.2ng a 4ng, 0.3ng a 3ng, 0.5ng a 2ng, o 0.1ng a 1ng de lectina por microgramo de proteína de choque térmico. En una realización preferida, la lectina es Con A.

0070 En una realización preferida, dicha glicoproteína es una proteína de choque térmico glicosilada (HSP), incluyendo tanto proteínas de choque térmico glicosiladas de origen natural (por ejemplo, gp96, GRP170, Calreticulin, BIP (GRP78), o una combinación de los mismos) y las proteínas de choque térmico que no están naturalmente glicosiladas se convierten a una glicoproteína añadiendo uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en las secuencias nativas que codifican la proteína de choque térmico seguido por la adición de grupos carbohidrato. El complejo inmunológicamente y/o biológicamente activo puede comprender además una molécula que muestra la antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa. En las realizaciones en las que las Moléculas Antigénicas son proteínas complejadas a Hsps *in vivo*, los complejos se pueden aislar de células (ver Sección 5.1). Alternativamente, un complejo antígeno-Hsp puede ser producido *in vitro* de preparaciones purificadas de Hsps y Moléculas Antigénicas (ver Sección 5.3). En esta realización, se pueden obtener antígenos de cáncer o agentes infecciosos por purificación de fuentes naturales, por síntesis química, o de forma recombinante. Las lectinas pueden formar oligómeros con complejos Hsp-antígeno producido tanto *in vivo* como *in vitro* por procedimientos *in vitro* como los descritos en la Sección 5.1 a 5.4. En una realización preferida, dicha lectina es una molécula

de lectina ligada a manosa. Más preferiblemente, la molécula de lectina ligada a manosa es Concanavalina A (Con A).

0071 Las composiciones y métodos de la presente invención se pueden utilizar en varias situaciones. Por ejemplo, la composición de la invención puede usarse para mejorar la inmunogenicidad de un complejo molecular y/o para provocar una respuesta inmune en un sujeto en el que el tratamiento o prevención de una enfermedad (por ejemplo, cáncer, una enfermedad infecciosa, anemia, enfermedad de deficiencia de hormona del crecimiento, enfermedad de deficiencia de la enzima, o una condición de inmunosupresión). Tal como aquí se usa, el término "sujeto" se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un humano, que tiene la enfermedad o es propenso a tener la enfermedad.

0072 De acuerdo con la invención, la administración de complejos oligomerizados inmunológicamente y/o biológicamente activos a un sujeto resulta en la provocación, estimulación, modulación (incluyendo la mejora y la regulación a la baja), y/o manteniendo una respuesta inmune y/o actividad biológica en el sujeto, en particular contra proteínas antigénicas específicas para una fuente de antígeno de interés. El complejo oligomerizado se puede administrar como una sola dosis o dosis múltiples. La dosis profiláctica o terapéutica puede variar para diferentes sujetos y diferentes aplicaciones terapéuticas o profilácticas.

0073 En una realización, la invención proporciona un método de inducir una respuesta inmune por una cantidad sub-inmunogénica de una composición de vacuna, en el que la oligomerización facilita la inducción de una respuesta inmune por una cantidad de composición de vacuna que es de otra forma insuficiente para inducir la respuesta inmune cuando se utiliza sin oligomerización.

0074 La presente invención también puede utilizarse para aumentar la actividad biológica de una fracción inmunoterapéutica y/o biológicamente activa mediante la adición de lectina para formar un oligómero. Como aquí se usa, el término "fracción inmunoterapéutica" se refiere a una molécula que es parte de un complejo inmunoterapéutico. Como aquí se usa, el término "oligómero" se refiere a un complejo de dos o más unidades (por ejemplo, un complejo que comprende una molécula de lectina y una molécula de HSP, o un complejo que comprende una molécula de lectina, y dos moléculas HSP, etc.) En una realización, un oligómero de la invención es un dímero que comprende fracciones inmunoterapéuticas y/o biológicamente activas y lectina. En otra realización, las fracciones inmunoterapéuticas y/o biológicamente activas forma especies de orden superior, es decir, un oligómero con más de dos subunidades. De acuerdo con la invención, la oligomerización de una fracción inmunoterapéutica y/o biológicamente activa aumenta sus actividades biológicas. En una realización preferida, el oligómero de la invención comprende una molécula de lectina y gp96.

0075 La presente invención también puede utilizarse para aumentar la absorción de vacuna en células presentadoras de antígeno (APCs) por sucesos mediados por receptores. Aunque no limitado por ninguna teoría, una de las posibles explicaciones de la absorción aumentada de vacuna en APCs por sucesos mediados por receptores es que más subunidades de un oligómero en el complejo inmunológicamente y/o biológicamente activo aumenta las interacciones con los receptores en las células presentadoras de antígenos en comparación con el complejo no oligomerizado donde sólo una subunidad interactúa con el receptor. En una realización específica, el receptor es CD91.

0076 La presente invención también puede utilizarse para aumentar la absorción de vacuna en células presentadoras de antígenos por sucesos no mediados por receptores. Algunos complejos inmunológicamente y/o biológicamente activos que comprenden glicoproteínas no funcionan por sucesos mediados por receptores. Por otra parte, aun cuando un complejo inmunológicamente y/o biológicamente activo ejerce algunas de sus funciones a través de sucesos mediados por receptores, todavía puede ejercer la misma o algunas otras funciones a través de sucesos no mediados por receptores. Por ejemplo, péptidos antigénicos asociados a proteína de choque térmico pueden ser absorbidos por células presentadoras de antígenos por sucesos no mediados por receptor que incluyen, pero no se limitan a, pinocitosis, fagocitosis, e interacciones no específicas con componentes de superficie celular y posterior inserción y/o translocación de complejos HSP-péptido por la membrana celular. De acuerdo con la invención, la oligomerización aumentará tal absorción. La oligomerización de fracciones biológicamente activas también aumenta su suministro a un sitio diana.

0077 En una realización específica, la presente invención proporciona un método de entregar una molécula antigénica a un sistema inmunitario de un sujeto que comprende administrar un complejo molecular que comprende una lectina y dicha Molécula Antigénica, en donde la Molécula Antigénica es o una glicoproteína de origen natural o una proteína que ha sido modificada para ser una glicoproteína.

5 0078 La presente invención puede usarse además para mejorar las capacidades adyuvantes de una fracción inmunoterapéutica. Como aquí se usa, el término "capacidades adyuvantes" se refiere a la capacidad de una sustancia no antigénica que, en combinación con un antígeno, mejora la respuesta inmune por, por ejemplo, inducir una respuesta inflamatoria, que conduce a una afluencia local de células inmunoactivas, tales como células que forman anticuerpos y linfocitos T. Fracciones inmunoterapéuticas con capacidades adyuvantes se
10 utilizan terapéuticamente en la preparación de vacunas, ya que aumentan la producción de anticuerpos contra pequeñas cantidades de antígeno y alargan el período de producción de anticuerpos y/o el nivel de respuesta inmune celular (por ejemplo, linfocitos T). Aunque no ligados por ninguna teoría, la oligomerización de las fracciones inmunoterapéuticas y/o biológicamente activas aumentarán sus capacidades adyuvantes. Como aquí se usa, la fracción inmunoterapéutica y/o biológicamente activa se refiere a una glicoproteína (incluyendo glicoproteína que ocurre naturalmente y glicoproteínas sintetizadas químicamente). En una realización
15 preferida, la glicoproteína es una proteína de choque térmico glicosilada incluyendo, pero no limitada a, gp96, GRP 170, Calreticulin, BIP (GRP78) o combinaciones de las mismas.

0079 La presente invención también puede utilizarse para mejorar el suministro de una fracción inmunoterapéutica y/o biológicamente activa. No limitado por ninguna teoría, la oligomerización de una fracción
20 inmunoterapéutica y/o biológicamente activa puede permitir al complejo aprovechar vías alternativas y más eficaces a sitios diana (por ejemplo, órganos tales como riñón, pulmón, hígado, corazón; tejidos, o células, tales como células presentadoras de antígenos, glóbulos rojos ("RBC"), macrófagos, linfocitos, o células que están implicadas en una vía particular de transducción de señales).

0080 Se describe aquí un método de captura de fracciones inmunoterapéuticas secundarias y de suministro de dicha fracción a una célula presentadora de antígeno por absorción mediada por receptor en un sujeto, que
25 comprende administrar al sujeto una composición de un complejo molecular, en la que dicho complejo molecular comprende una primera glicoproteína oligomerizada con una segunda glicoproteína en presencia de moléculas de lectina, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de glicoproteína es igual o superior a 5ng, 10ng, 20ng, 30ng, 40ng, 50ng, 75ng, 100ng, o 200ng por microgramo de glicoproteína. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de glicoproteína es 40ng a 1000ng, 50ng a 1000ng, 50ng a 500ng, 100ng a 250ng, o 150ng a 200ng de lectina por microgramo de glicoproteína. En algunas realizaciones, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de glicoproteína es igual o inferior a 5ng por microgramo de glicoproteína. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de glicoproteína es
35 entre 0.1ng a 5ng, 0.2ng a 4ng, 0.3ng a 3ng, 0.5 ng a 2ng, o 0.1ng a 1ng de lectina por microgramo de glicoproteína. El complejo molecular puede comprender además una o más moléculas, preferiblemente péptidos, que muestran antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa. En una realización, la segunda glicoproteína es diferente de la primera glicoproteína. En otra realización, la primera glicoproteína puede ser absorbida por una célula presentadora de antígeno, y la segunda glicoproteína normalmente no será capaz de ser absorbida por una célula presentadora de antígeno u otras células diana como se ha descrito anteriormente, y la oligomerización de la primera glicoproteína a la segunda glicoproteína permite que la segunda glicoproteína pueda ser absorbida por una célula presentadora de antígeno.
40

0081 En una realización específica, la primera glicoproteína es un elemento de proteína de choque térmico glicosilada, y la segunda glicoproteína se selecciona del mismo grupo, pero es un elemento diferente. En otra realización, la primera glicoproteína es un elemento de proteína de choque térmico glicosilada, y la segunda glicoproteína no es una proteína de choque térmico. En otra realización, la primera glicoproteína no es una proteína de choque térmico y la segunda glicoproteína es una proteína de choque térmico. En otra realización, ni la primera ni la segunda glicoproteína es una proteína de choque térmico. En una realización preferida, la
45

primera glicoproteína se asocia además con una Molécula Antigénica que muestra la antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa. En otra realización preferida, la segunda glicoproteína se asocia además con una Molécula Antigénica que muestra antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa.

5 0082 Se describe aquí un método para tratar o prevenir una enfermedad (por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa, anemia, afecciones inmunosupresoras, deficiencias enzimáticas o deficiencias hormonales) que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una composición de la invención. En una realización, la composición comprende un complejo no covalente
10 purificado que comprende una proteína de choque térmico, una Molécula Antigénica, y una molécula de lectina, en donde la proteína de choque térmico y/o la Molécula Antigénica están glicosiladas, en donde la Molécula Antigénica muestra antigenicidad de un antígeno de dicho tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de dicha enfermedad infecciosa, y donde la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es igual o superior a 5ng, 10ng, 20ng, 30ng, 40ng, 50ng, 75ng, 100ng, o 200ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en la
15 composición respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es 40ng a 1000ng, 50ng a 1000ng, 50ng a 500ng, 100ng a 250ng, o 150ng a 200ng lectina por microgramo de proteína de choque térmico. En algunas realizaciones, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es igual o inferior a 5ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es entre 0.1ng a 5ng, 0.2ng a 4ng, 0.3ng a 3ng, 0.5ng a 2ng, o 0.1ng a 1ng de lectina por microgramo de proteína de choque térmico.

0083 En otra realización, la composición es una composición farmacéutica que comprende un complejo molecular y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde el complejo molecular comprende una proteína de choque térmico, una Molécula Antigénica, y una molécula de lectina, en donde la proteína de choque térmico y/o la Molécula Antigénica están glicosiladas, en donde la Molécula Antigénica muestra antigenicidad de un
25 antígeno de dicho tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de dicha enfermedad infecciosa, y donde la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es igual a o superior a 5ng, 10ng, 20ng, 30ng, 40ng, 50ng, 75ng, 100ng, 200ng o por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es 40ng a 1000ng, 50ng a 1000ng, 50ng a 500ng, 100ng a 250ng, o 150ng a 200ng de lectina por microgramo de proteína de choque térmico. En algunas realizaciones, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es igual o inferior a 5ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en la composición respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es de entre 0.1ng a 5ng, 0.2ng a 4ng, 0.3ng a 3ng, 0.5ng a 2ng, o 0.1ng a 1ng lectina por microgramo de proteína de choque térmico.

0084 Se describe aquí un método para tratar o prevenir una enfermedad (por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa, anemia, afecciones inmunosupresoras, deficiencias enzimáticas o deficiencias hormonales) que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello (a) uno o más complejos moleculares de una glicoproteína (por ejemplo, una Hsp glicosilada), una lectina, y una primera Molécula Antigénica, en donde la primera Molécula Antigénica muestra la antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa, y en donde la Molécula Antigénica puede o no estar glicosilada, y donde la cantidad de lectina presente en los complejos respecto a la cantidad de glicoproteína es igual o superior a 5ng, 10ng, 20ng, 30ng, 40ng, 50ng, 75ng, 100ng, o 200ng por microgramo de glicoproteína. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en los complejos respecto a la cantidad de glicoproteína es 40ng a 1000ng, 50ng a 1000ng, 50ng a 500ng, 100ng a 250ng, o 150ng a 200ng de lectina por microgramo de glicoproteína. En algunas realizaciones, la cantidad presente de lectina en los complejos respecto a la cantidad de glicoproteína es igual o inferior a 5ng por microgramo de glicoproteína. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en los complejos respecto a la cantidad de glicoproteína es entre 0.1ng a 5ng, 0.2ng a 4ng, 0.3ng a 3ng, 0.5ng a 2ng, o 0.1ng a 1ng de lectina por microgramo de glicoproteína, y (b) antes, simultáneamente, o después de la administración del complejo molecular, administrar al sujeto una composición
45 que comprende células presentadoras de antígeno sensibilizadas *in vitro* con una cantidad sensibilizante de un

segundo complejo molecular de la glicoproteína asociada con una molécula de lectina y una segunda Molécula Antigénica, en donde dicha segunda Molécula Antigénica muestra la antigenicidad de un segundo antígeno de dicho tipo de cáncer o de un segundo antígeno de un agente de dicha enfermedad infecciosa. La APC puede ser seleccionada de entre las células presentadoras de antígenos conocidas en la materia, incluyendo pero no limitadas a macrófagos, células dendríticas, linfocitos B, y una combinación de los mismos, y son preferiblemente macrófagos. En una realización, el primer complejo molecular es el mismo que el segundo complejo molecular utilizado para sensibilizar las APCs. En otra realización, el primer complejo molecular es diferente del segundo complejo molecular utilizado para sensibilizar las APCs. En una realización específica donde las APCs y las composiciones de la invención se administran al mismo tiempo, las APCs y la composición de la invención pueden estar presentes en la misma composición (que comprende APCs y los complejos moleculares) o en una composición diferente. La inmunoterapia adoptiva (que utiliza APCs sensibilizadas) de acuerdo con la invención permite la activación de las células inmunes presentadoras de antígeno mediante incubación con complejos molécula oligomerizados. Preferiblemente, antes de usar las células *in vivo*, se hace la medición de reactividad contra el agente infeccioso o tumoral *in vitro*. Este refuerzo *in vitro* seguido por selección y/o expansión clonal, y administración al paciente constituye una estrategia terapéutica/profiláctica útil. En una realización preferida, la glicoproteína es una proteína de choque térmico glicosilada.

0085 En una realización preferida, la fracción inmunológicamente y/o biológicamente activa del complejo molecular, por ejemplo una proteína de choque térmico complejada con una proteína que muestra antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa, es autóloga para el sujeto, es decir, que está aislada de las células del propio sujeto (por ejemplo, preparada a partir de biopsias de tumores del paciente cuando se desea el tratamiento del cáncer). Alternativamente, el complejo molecular puede ser alogénico para el sujeto al que se administra una composición del complejo molecular de la invención. El complejo molecular se puede preparar *in vitro*, por ejemplo, a partir de células cultivadas que de forma recombinante expresan una proteína de choque térmico. La proteína de choque térmico puede ser una proteína de choque térmico naturalmente glicosilada (por ejemplo, gp96, GRP170, Calreticulin, BIP (GRP78), o una combinación de los mismos), una proteína de choque térmico no naturalmente glicosilada que es convertida en una glicoproteína, o una combinación de las mismas.

0086 Antígenos exógenos y fragmentos y derivados de los mismos para uso en complejar con glicoproteínas para generar los complejos específicos pueden ser seleccionados de entre los conocidos en la técnica, así como aquellos identificados fácilmente por inmunoensayos convencionales conocidos en la materia por la capacidad de unir moléculas anticuerpo o MHC (antigenicidad) o generar respuesta inmune (inmunogenicidad). Los ejemplos no limitantes de antígenos exógenos incluyen, pero no se limitan a, antígenos específicos de cáncer, antígenos asociados con cáncer, antígenos expresados por una línea celular o un sujeto que está infectado con un patógeno o transfectado con un gen que codifica un antígeno específico del tumor, un antígeno asociado al tumor, o un antígeno de un agente de un patógeno. Pueden aislarse complejos específicos de glicoproteínas y Moléculas Antigénicas del tejido canceroso o precanceroso de un paciente, o de una línea celular de cáncer, o pueden producirse *in vitro* (como es necesario en la realización en la que se utiliza un antígeno exógeno como la Molécula Antigénica).

0087 La presente invención proporciona kits que comprenden una pluralidad de recipientes cada uno comprendiendo una formulación o composición farmacéutica que comprende una dosis de complejos moleculares de la invención suficiente para una administración inmunogénica única. La invención también proporciona kits que comprenden un recipiente que comprende una glicoproteína inmunoactiva o un complejo de la misma, y un recipiente que comprende lectina. Opcionalmente, pueden incluirse en los kits instrucciones para formular los complejos oligomerizados de acuerdo con los métodos de la invención.

0088 En una realización específica, la presente invención se refiere a composiciones para uso en la prevención y tratamiento de enfermedades neoplásicas primarias y metastásicas.

0089 Los regímenes terapéuticos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden utilizarse con otro tratamiento terapéutico o profiláctico, tal como otros potenciadores de respuesta inmune o modificadores de

respuesta biológica incluyendo, pero no limitado a, citoquinas, agonistas o antagonistas de diversos ligandos, receptores y moléculas de transducción de señales, ácidos nucleicos inmunoestimulantes, y adyuvantes. De acuerdo con este aspecto de la invención, las composiciones de la invención se administran en terapia de combinación con uno o más de estos potenciadores de respuesta inmune o modificadores de respuesta biológica. En otra realización, las composiciones de la invención se administran con radioterapia o uno o más agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer.

0090 Además de terapia de cáncer, las composiciones de la invención pueden usarse para la prevención de una variedad de cánceres, por ejemplo, en sujetos que están predispuestos como resultado de historia familiar o en sujetos con un mayor riesgo de cáncer debido a factores ambientales.

0091 Regímenes terapéuticos específicos, composiciones farmacéuticas y kits son proporcionados por la invención.

5.1. Preparaciones de Proteínas de Choque Térmico

0092 El complejo molecular de la invención comprende una lectina asociada con una proteína de choque térmico glicosilada complejada con una Molécula Antigénica (por ejemplo, una o más proteínas (incluyendo péptidos y polipéptidos) que muestran antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa). La proteína de choque térmico o los complejos de Molécula Antigénica-Hsp se pueden preparar por separado, y la lectina añadirse como un paso adicional para promover la oligomerización de las Hsps o complejos de Molécula Antigénica-Hsp.

0093 Las proteínas de choque térmico (HSPs) se refieren aquí indistintamente como proteínas de estrés y pueden ser seleccionadas de entre cualquier proteína celular que satisface los siguientes criterios: es una proteína cuya concentración intracelular aumenta cuando una célula se expone a un estímulo estresante, es capaz de ligar otras proteínas, es capaz de liberar las proteínas ligadas en presencia de trifosfato de adenosina (ATP) o pH bajo (por ejemplo, pH de 1, 2, 3, 4, 5 o 6), y es una proteína que muestra por lo menos 35% de homología con cualquier proteína celular que tenga cualquiera de las propiedades anteriores. Ejemplos no limitantes de proteínas de choque térmico se describen en Srivastava, Nature Reviews (Inmunología) 2:185-194 (2002). En algunas realizaciones, sólo se utilizan proteínas de choque térmico naturalmente glicosiladas, que incluyen pero no se limitan a, gp96, calreticulina, GRP 170, BIP (GRP78) o complejos no covalentes o covalentes de las mismas. En algunas realizaciones de la invención, una proteína de choque térmico se convierte en una proteína de choque térmico glicosilada por adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en las secuencias nativas de la proteína de choque térmico seguida por la adición de hidratos de carbono.

0094 De acuerdo con los métodos aquí descritos, cada complejo específico Hsp-antigénico (complejo proteína-Hsp) empleado en una composición de la invención se purifica preferiblemente en el intervalo de 60 a 100 por ciento del total de mg de proteína, o por lo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% del total de mg de proteína. En otra realización, cada complejo de Molécula Antigénica-Hsp específica es purificado hasta homogeneidad aparente, como se ensayó mediante electroforesis en gel de sodio dodecil sulfato-poliacrilamida.

0095 En una realización preferida, complejos no covalentes de Hsps (por ejemplo, hsp70, hsp90 y gp96) con proteínas son purificados y preparados postoperatoriamente de células tumorales obtenidas a partir del paciente con cáncer para uso en forma de complejos específicos en las composiciones de la invención.

0096 De acuerdo con los métodos aquí descritos, las proteínas inmunogénicas o antigénicas (incluyendo péptidos y polipéptidos) que están complejadas de forma endógena a antígenos Hsps o MHC se pueden utilizar como Moléculas Antigénicas específicas. Por ejemplo, pueden ser preparadas proteínas tales que estimulen respuestas de células T citotóxicas contra diferentes antígenos tumorales (por ejemplo, tirosinasa, gp100, Melan-A, gp75, mucinas, etc.) y proteínas víricas incluyendo, pero no limitado a, proteínas del virus de inmunodeficiencia tipo I (HIV-I), virus de inmunodeficiencia humana tipo II (VIH-II), hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, influenza, varicela, adenovirus, herpes simple tipo I (HSV-I), herpes simple tipo II (VHS-II),

peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus respiratorio sincitial, virus del papiloma, papovavirusla, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, huntavirus, virus Cocksackie, virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus de la rubéola y virus de la polio. En la realización en la que las Moléculas Antigénicas son proteínas complejadas a Hsps *in vivo*, los complejos se pueden aislar de células. Alternativamente, los complejos pueden ser producidos *in vitro* a partir de preparaciones purificadas de cada uno de Hsps y Moléculas Antigénicas. En algunas realizaciones, las Moléculas Antigénicas son antígenos exógenos y fragmentos y derivados de los mismos.

0097 En las realizaciones en las que se desea utilizar moléculas antigénicas por complejación a Hsps *in vitro*, se pueden purificar Hsps para tal uso de los complejos de proteína-Hsp endógena en presencia de ATP o de pH bajo (pH 1, 2, 3, 4, 5, o 6). Hsps también pueden sintetizarse químicamente o producirse de forma recombinante. Los protocolos descritos aquí pueden ser utilizados para aislar complejos específicos proteína-Hsp o las HSPs solas, de cualquier célula eucariota, por ejemplo, tejidos, células aisladas, o líneas celulares eucariotas inmortalizadas infectadas con un patógeno intracelular pre-seleccionado, células tumorales o líneas celulares tumorales.

5.1.1 Preparación y Purificación de Complejos Hsp70 o proteína-Hsp70

0098 La purificación de complejos de proteína-Hsp70 se ha descrito anteriormente, ver, por ejemplo, Udono et al., 1993, J. Exp. Med. 178:1391-1396. Un procedimiento que puede utilizarse, presentado a modo de ejemplo pero no de limitación, se describe a continuación.

0099 Inicialmente, se suspenden células tumorales en 3 volúmenes de tampón Lisis 1X que consiste en 30 mM bicarbonato sódico pH 7,5, 1 mM PMSF. A continuación, el pellet se somete a sonicación, en hielo, hasta que > 99% de las células están lisadas como se determina por examen microscópico. Como una alternativa a la sonicación, las células pueden ser lisadas por cizallamiento mecánico homogeneizando las células en un homogeneizador Dounce hasta que > 95% de las células están lisadas.

0100 A continuación, el lisado se centrifuga a 1.000g durante 10 minutos para eliminar las células intactas, núcleos y otros residuos celulares. El sobrenadante resultante se recentrifuga a 100.000g durante 90 minutos, se cosecha el sobrenadante y luego se mezcla con Con A Sepharose equilibrada con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene 2mM Ca²⁺ y 2mM Mg²⁺. Cuando las células se lisan por cizallamiento mecánico el sobrenadante es diluido con un volumen igual de tampón de lisis 2X antes de mezclar con Con A Sepharosa. El sobrenadante se deja unir a la Con A Sepharose durante 2-3 horas a 4°C. El material que no se puede enlazar es cosechado y se dializa durante 36 horas (tres veces, 100 volúmenes cada vez) contra 10 mM Tris-acetato pH.7.5, 0.1 mM EDTA, 10 mM de NaCl, 1 mM PMSF. A continuación, el dializado es centrifugado a 17.000 rpm (Sorval1 SS34) durante 20 minutos. A continuación, el sobrenadante resultante es cosechado y aplicado a una columna de FPLC Mono Q equilibrada en 20 mM Tris-acetato, pH 7,5, 20 mM de NaCl, 0,1 mM EDTA y 15 mM 2-mercaptoetanol. La columna es luego desarrollada con un gradiente de NaCl de 20 mM a 500 mM y después las fracciones eluidas son fraccionadas por electroforesis en gel dodecil sulfato de sodio -poliacrilamida (SDS-PAGE) y se caracteriza por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-HSP70 apropiado (tal como del clon N27F3-4, de StressGen).

0101 Las fracciones fuertemente inmunorreactivas con el anticuerpo anti-HSP70 se agrupan y los complejos de HSP70-proteína se precipitan con sulfato de amonio; específicamente con un 50%-70% de corte de sulfato de amonio. El precipitado resultante es luego cosechado por centrifugación a 17.000 rpm (rotor SS34 Sorvall) y lavado con sulfato de amonio 70%. El precipitado lavado es luego solubilizado y cualquier sulfato de amonio residual se elimina por filtración en gel en una columna SephadexR G25 (Pharmacia). Si es necesaria la preparación HSP70 así obtenida puede ser repurificada a través de la columna FPLC Mono Q como se ha descrito anteriormente.

0102 El complejo Hsp70-proteína puede ser purificado a la homogeneidad aparente usando este método. Normalmente 1 mg de complejo Hsp70-proteína puede ser purificada a partir de 1 g de células/tejidos.

0103 Un método mejorado para purificación de HSP70 comprende poner en contacto proteínas celulares con ATP o un análogo no hidrolizable de ATP fijado a un sustrato sólido, de modo que la HSP70 en el lisado se puede unir a la ATP o a la ATP analógica no hidrolizable, y eluir el HSP70 ligado. Un método preferido utiliza cromatografía en columna con ATP fijada a un sustrato sólido (por ejemplo, ATP-agarosa). Las preparaciones HSP70 resultantes son más altas en la pureza y están desprovistas de proteínas contaminantes. Los rendimientos de HSP70 también se incrementan significativamente en alrededor de más de 10 veces.

0104 Alternativamente, se puede utilizar cromatografía con análogos no hidrolizables de ADP, en lugar de ATP, para la purificación de HSP70-proteína. Ver Peng et al., Revista de Métodos Inmunológicos 204:13-21 (1997). A modo de ejemplo pero no de limitación, la purificación de HSP70 libre de proteínas por cromatografía de ATP-agarosa puede llevarse a cabo como sigue: Células de sarcoma Meth A (500 millones de células) se homogeneizan en tampón hipotónico y el lisado se centrifuga a 100.000 g durante 90 minutos a 4°C. El sobrenadante se aplica a una columna de ATP-agarosa. La columna se lava con tampón y se eluye con 5 volúmenes de columna de 3 mM de ATP. Las HSP70 se eluyen en fracciones 2 a 10 del total de 15 fracciones que se eluyen. Las fracciones eluidas se analizan por SDS-PAGE. La HSP70 puede ser purificada hasta homogeneidad aparente usando este procedimiento.

0105 Alternativamente, puede purificarse Hsp70 o Hsp70-proteína mediante métodos de purificación de inmunoafinidad conocidos en la materia. Por ejemplo, se puede utilizar columna scFv específica de Hsp70. (Véase Arnold-Schild et al., Cancer Research, 2000, 60 (15):4175-4178. Aunque Arnold-Schild describe una columna scFv gp96-específica, una columna scFv específica de Hsp70 puede ser producida por el método equivalente). A modo de ejemplo pero no de limitación, la purificación utilizando columna scFv específica de Hsp70 puede llevarse a cabo como sigue: scFv anti-Hsp70 se acoplan a Sepharose CNBr-activada. Las muestras que contienen Hsp70 o complejo Hsp70-proteína se aplican a la columna scFv anti-Hsp70. Después de lavado abundante con PBS, Hsp70 o Hsp70-proteína puede eluirse con PBS, 1.3 M NaCl, o 10 mM fosfato de sodio (pH 7,2).

0106 La separación de la proteína de un complejo proteína-Hsp70 puede realizarse en presencia de ATP o de bajo pH. Estos dos métodos pueden ser utilizados para eluir la proteína de un complejo de proteína Hsp70. El primer enfoque implica incubar una preparación de complejo Hsp70-proteína en presencia de ATP. El otro enfoque implica incubar una preparación de complejo Hsp70-proteína en un tampón de pH bajo (por ejemplo, pH es 1, 2, 3, 4, 5 o 6). Estos métodos y cualesquiera otros conocidos en la técnica se pueden aplicar para separar la HSP y proteína de un complejo Hsp-proteína.

5.1.2 Preparación y Purificación de Hsp90 o Complejos proteína-Hsp90

0107 Un procedimiento que se puede utilizar, presentado a modo de ejemplo y sin limitación, es como sigue:

0108 Inicialmente, células humanas o de mamífero se suspenden en 3 volúmenes de tampón de lisis 1X compuesto de tampón fosfato sódico 5 mM (pH 7), 150 mM NaCl, 2 mM de CaCl₂, 2 mM MgCl₂ y 1 mM fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF). A continuación, el granulado es sonificado, en hielo, hasta que >99% de células están lisadas como se determina por examen microscópico. Como una alternativa a la sonicación, las células pueden ser lisadas por cizallamiento mecánico y en este enfoque las células normalmente se resuspenden en bicarbonato de sodio 30 mM (pH 7,5), 1 mM PMSF, se incuban en hielo durante 20 minutos y luego se homogeneizan en un homogeneizador Dounce hasta > 95% células son lisadas.

0109 A continuación, el lisado se centrifuga a 1.000g durante 10 minutos para eliminar células intactas, núcleos y otros residuos celulares. El sobrenadante resultante se recentrifuga a 100.000g durante 90 minutos, el sobrenadante se cosecha y luego se mezcla con Con A Sepharosa™ equilibrado con PBS que contiene 2 mM Ca²⁺ y 2 mM Mg²⁺. Cuando las células son lisadas por cizallamiento mecánico el sobrenadante es diluido con un volumen igual de tampón de lisis 2X antes de mezclar con Con A Sepharosa™. El sobrenadante se deja unir a la Con A Sepharosa™ durante 2-3 horas a 4°C. El material que no se puede enlazar se cosecha y se dializa durante 36 horas (tres veces, 100 volúmenes cada vez) contra Fosfato Sódico 20 mM (pH 7,4), 1 mM EDTA, 250 mM NaCl, 1 mM PMSF. A continuación, el dializado se centrifuga a 17.000 rpm (rotor Sorvall SS34) durante

20 minutos. A continuación, el sobrenadante resultante se cosecha y se aplica a una columna cromatográfica de intercambio iónico Mono Q FPLC™ (Pharmacia) equilibrada con tampón de diálisis. Las proteínas se eluyen luego con un gradiente salino de 200 mM a 600 mM de NaCl.

5 0110 Las fracciones eluidas son fraccionadas por SDS-PAGE y las fracciones que contienen los complejos proteínas-hsp90 identificadas por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-hsp90 tales como 3G3 (Affinity Bioreagents). Los complejos proteína-Hsp90 pueden ser purificados hasta homogeneidad aparente usando este procedimiento. Típicamente, 150-200 µg de complejo proteína-hsp90 se pueden purificar a partir de 1g de células/tejidos.

10 0111 Alternativamente, Hsp90 o Hsp90-proteína puede purificarse mediante cualquier método de purificación de inmutafinidad conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar columna scFv Hsp90 específica. (Ver Arnold-Schild, incorporado aquí en su totalidad. Aunque Arnold-Schild describe una columna de scFv específica de gp96, una columna scFv específica-Hsp90 puede ser producido por el método equivalente). A modo de ejemplo pero no de limitación, la purificación utilizando columna scFv específica de Hsp90 puede llevarse a cabo como sigue: scFv anti-Hsp90 están acoplados a Sepharose CNBr-activada. Las muestras que contienen
15 Hsp90 o complejo Hsp90-proteína se aplican a la columna scFv anti-Hsp70. Después de lavado abundante con PBS, Hsp90 o Hsp90-proteína puede ser eluida con PBS, 1,3 M NaCl, o fosfato de sodio 10mM (pH 7,2).

20 0112 La separación de la proteína de un complejo hsp90-proteína puede realizarse en presencia de ATP o bajo pH. Estos dos métodos pueden ser utilizados para eluir la proteína de un complejo hsp90-proteína. El primer enfoque implica la incubación de una preparación de complejo hsp90-proteína en presencia de ATP. El otro enfoque implica la incubación de una preparación de complejo hsp90-proteína en un tampón de pH bajo (por ejemplo, el pH es 1, 2, 3, 4, 5 o 6). Estos métodos y cualesquiera otros conocidos en la técnica pueden aplicarse para separar la HSP y proteína de un complejo Hsp-proteína.

5.1.3 Preparación y Purificación de Gp96 o Complejos proteína-Gp96

25 0113 Un procedimiento que puede ser utilizado, presentado a modo de ejemplo y no de limitación, es como sigue:

0114 Un pellet de células humanas o de mamífero se resuspende en 3 volúmenes de tampón consistente en 30 mM tampón de bicarbonato de sodio (pH 7,5) y PMSF 1mM y las células se dejan hinchar en hielo 20 minutos. El pellet celular se homogeneiza en un homogeneizador Dounce (la adecuada habilitación del homogeneizador variará de acuerdo con cada tipo de célula) en hielo hasta que > 95% de células son lisadas.

30 0115 El lisado se centrifuga a 1.000 g durante 10 minutos para eliminar células intactas, núcleos y otros desechos. El sobrenadante de esta centrifugación se recentrifuga a continuación a 100.000 g durante 90 minutos. El complejo gp96-proteína puede purificarse ya sea desde el pellet 100.000 o del sobrenadante.

35 0116 Cuando se purifica del sobrenadante, el sobrenadante se diluye con un volumen igual de tampón de lisis 2X y el sobrenadante se mezcla durante 2-3 horas a 4°C con Con A Sepharosa™ equilibrado con PBS que contiene 2 mM Ca²⁺ y 2 mM Mg²⁺. Luego, la suspensión se empaqueta en una columna y se lava con tampón de lisis 1X hasta que el OD₂₈₀ cae al valor basal. Luego, la columna se lava con un volumen de lecho de 1/3 de columna de 10% α-metil manósido (α-MM) disuelto en PBS que contiene 2 mM Ca²⁺ y 2 mM Mg²⁺, la columna es sellada con un trozo de parafilm, e incubada a 37°C durante 15 minutos. Luego la columna se enfría a temperatura ambiente y el parafilm es retirado de la parte inferior de la columna. Cinco volúmenes de columna
40 del tampón α-MM se aplican a la columna y el eluato se analiza por SDS-PAGE. Típicamente, el material resultante es un 60-95% puro, sin embargo, esto depende del tipo de célula y la relación de tampón tejido/lisis utilizado. Luego la muestra se aplica a una columna cromatográfica de intercambio iónico Mono Q FPLC™ (Pharmacia) equilibrada con un tampón que contiene fosfato de sodio 5mM (pH 7). Las proteínas se eluyen de la columna con un gradiente de 0-1M NaCl y la fracción gp96 eluye entre 400mM y 550mM NaCl.

45 0117 El procedimiento, sin embargo, puede ser modificado por dos pasos adicionales, utilizados solos o en combinación, para producir consistentemente complejos gp96-proteína aparentemente homogéneos. Un paso

opcional implica una precipitación con sulfato de amonio antes del paso de purificación de Con A y el otro paso opcional implica la purificación DEAE-Sepharosa™ después del paso de purificación de Con A y en lugar del paso Mono Q FPLC™.

5 0118 En el primer paso opcional, que se describe a modo de ejemplo como sigue: el sobrenadante resultante del paso de centrifugación 100.000 g es llevado a una concentración final de sulfato de amonio 50% mediante la adición de sulfato de amonio. El sulfato amónico se añade lentamente mientras se agita suavemente la solución en un vaso de precipitados colocado en una bandeja de agua helada. La solución se agita desde aproximadamente 1/2 a 12 horas a 4°C y la solución resultante se centrifuga a 6.000 rpm (rotor Sorvall SS34). El sobrenadante resultante de este paso es extraído, llevado al 70% de saturación de sulfato de amonio por adición de solución de sulfato de amonio, y centrifugado a 6.000 rpm (rotor Sorvall SS34). El pellet resultante de esta etapa es cosechado y suspendido en PBS que contiene 70% de sulfato de amonio con el fin de enjuagar el pellet. Esta mezcla es centrifugada a 6.000 rpm (rotor Sorvall SS34) y el pellet disuelto en PBS que contenía 2 mM Ca²⁺ y Mg²⁺. El material no disuelto es separado por una breve centrifugación a 15.000 rpm (rotor Sorvall SS34). Luego, la solución es mezclada con Con A Sepharosa™ y el procedimiento seguido como antes.

15 0119 En el segundo paso opcional, descrito a modo de ejemplo como sigue: las fracciones que contienen gp96 eluidas de la columna de Con A se agrupan y el tampón se intercambia por tampón 5 mM fosfato sódico (pH 7), 300mM de NaCl por diálisis, o preferiblemente por intercambio de tampón en una columna de Sephadex G25. Después del intercambio de tampón, la solución es mezclada con DEAE-Sepharosa™ previamente equilibrada con tampón fosfato de sodio 5mM (pH 7), 300mM de NaCl. La solución de proteína y las perlas se mezcla suavemente durante 1 hora y se vierte en una columna. Luego, la columna es lavada con tampón fosfato de sodio 5 mM (pH 7), 300mM NaCl, hasta que la absorbancia a 280nm cae al valor basal. Luego, la proteína unida es eluida de la columna con cinco volúmenes de tampón 5mM fosfato sódico (pH 7), 700mM de NaCl. Las fracciones que contienen proteína son reunidas y diluidas con tampón fosfato de sodio 5 mM (pH 7) con el fin de disminuir la concentración de sal a 175mM. El material resultante se aplica luego opcionalmente a la columna cromatográfica de intercambio iónico Mono Q FPLC™ (Pharmacia) equilibrada con tampón fosfato de sodio 5mM (pH 7) y la proteína que se une a la columna cromatográfica de intercambio iónico Mono Q FPLC™ (Pharmacia) son entonces eluidas de la columna con un gradiente de 0-1M NaCl. La fracción gp96 se eluye entre 400mM y 550mM de NaCl.

30 0120 Se apreciará, sin embargo, que un experto en la materia puede evaluar, por experimentación de rutina, el beneficio de incorporar el segundo paso opcional en el protocolo de purificación. Además, se aprecia también que el beneficio de la adición de cada uno de los pasos opcionales dependerá de la fuente del material de partida.

35 0121 Cuando la fracción gp96 está aislada del pellet 100.000g, el pellet es suspendido en 5 volúmenes de PBS que contiene sea desoxicolato sódico al 1% o glucopiranosido octilo al 1% (pero sin Mg²⁺ y Ca²⁺) e incubado en hielo durante 1 hora. La suspensión es centrifugada a 20.000g durante 30 minutos y el sobrenadante resultante se dializa contra varios cambios de PBS (también sin Mg²⁺ y Ca²⁺) para eliminar el detergente. El dializado es centrifugado a 100.000 g durante 90 minutos, el sobrenadante cosechado, y se añade calcio y magnesio al sobrenadante para dar concentraciones finales de 2mM, respectivamente. Luego la muestra se purifica sea por el método modificado o el no modificado para aislar el complejo gp96-proteína del sobrenadante 100.000g, ver arriba.

40 0122 Los complejos gp96-proteínas pueden ser purificados hasta homogeneidad aparente usando este procedimiento. Acerca de 10-20µg de gp96 pueden ser aislados de 1g de células/tejido.

45 0123 Alternativamente, gp96 o gp96-proteína pueden purificarse mediante cualquier método de purificación de inmunoafinidad conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar columna scFv específica de Hsp96. (Ver Arnold-Schild, Cancer Research, 2000, 60 (15):4175-4178).

0124 La separación de la proteína de un complejo gp96-proteína puede realizarse en presencia de ATP o pH bajo (por ejemplo, un pH de 1, 2, 3, 4, 5 o 6). Estos dos métodos pueden ser utilizados para eluir la proteína de

un complejo gp96-proteína. El primer enfoque implica la incubación de una preparación gp96-proteína en presencia de ATP.

5.1.4 Preparación y Purificación de Complejos Hsp 110-proteína

5 0125 Un procedimiento, descrito por Wang et al., 2001, J. Immunol. 166(1):490-7, que puede ser utilizado, presentado a modo de ejemplo y sin limitación, es como sigue:

10 0126 Un pellet (40-60 ml) de célula o tejido, por ejemplo, tejido de células tumorales, se homogeneiza en 5 volúmenes de tampón hipotónico (30 mM bicarbonato de sodio, pH 7,2, e inhibidores de proteasa) por homogeneización Dounce. El lisado se centrifuga a 4.500 x g, y luego 100.000 x g durante 2 horas. Si las células o tejidos son de origen hepático, el sobrenadante resultante se aplica primero a una columna de Sepharose azul (Pharmacia) para eliminar la albúmina. De lo contrario, el sobrenadante resultante se aplica a una columna Con A-Sepharose (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) equilibrada previamente con tampón de unión (20mM Tris-HCl, pH 7,5; 100mM de NaCl; 1mM MgCl₂, 1 mM de CaCl₂, 1 mM MnCl₂; y 15 mM de 2-ME). Las proteínas unidas se eluyen con tampón de unión que contiene 15% α -D-o-metilmanosido (Sigma, St. Louis, MO).

15 0127 El material no unido Con A-Sepharosa se dializa contra una primera solución de 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM de NaCl, y 15 mM de 2-ME, y luego se aplica a una columna de DEAE-Sepharosa y se eluyó por gradiente de sal de 100 a 500 mM de NaCl. Las fracciones que contienen hsp110 son recogidas, dializadas, y cargadas en una columna Mono Q (Pharmacia) 10/10 equilibrada con 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 200 mM de NaCl, y 15 mM de 2-ME. Las proteínas unidas se eluyen con un gradiente de NaCl 200-500 mM. Las fracciones se analizan por SDS-PAGE seguido por inmunotransferencia con un Ab para Hsp110, como se ha descrito por Wang et al., 1999, J. Immunol. 162:3378. Las fracciones acumuladas que contienen Hsp110 se concentran por Centriplus (Amicon, Beverly, MA) y se aplican a una columna de Superose 12 (Pharmacia). Las proteínas se eluyen por 40 mM Tris-HCl, pH 8,0; NaCl 150 mM y 15 mM de 2-ME con un caudal de 0,2 ml/min.

25 0128 Alternativamente, Hsp110 o Hsp110 proteína pueden purificarse mediante cualquier método de purificación de inmutafinidad conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar columna scFv Hsp 110-específica. (Ver Arnold-Schild et al., Cancer Research, 2000, 60(15):4175-4178, Aunque Arnold-Schild describe una columna scFv gp96-específica, una columna scFv Hsp110-específica puede ser producido por el método equivalente). A modo de ejemplo pero sin limitación, la purificación utilizando columna scFv Hsp110-específica puede llevarse a cabo como sigue: scFv anti-Hsp110 se acoplan a Sepharose CNBr-activada. Las muestras que contienen Hsp110 o complejo Hsp110-proteína se aplican a la columna scFv anti-Hsp110. Después de lavado abundante con PBS, Hsp110 o Hsp110 proteína pueden ser eluidos con PBS, 1.3 M NaCl, o fosfato de sodio 10mM (pH 7,2).

5.1.5 Preparación y Purificación de Complejos Grp 170-proteína

35 0129 Un procedimiento, descrito por Wang et al., 2001, J. Immunol. 166(1):490-7, que puede ser utilizado, presentado a modo de ejemplo y sin limitación, es como sigue:

40 0130 Un pellet (40-60 ml) de célula o tejido, por ejemplo, tejido de células tumorales, se homogeneiza en 5 volúmenes de tampón hipotónico (30 mM bicarbonato de sodio, pH 7,2, e inhibidores de proteasa) por homogeneización Dounce. El lisado se centrifuga a 4,500 x g, y luego a 100,000 x g durante 2 horas. Si las células o tejidos son de origen hepático, el sobrenadante resultante se aplica primero a una columna de Sepharose azul (Pharmacia) para eliminar la albúmina. De lo contrario, el sobrenadante resultante se aplica a una columna Con A-Sepharose (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) equilibrada previamente con tampón de unión (20mM Tris-HCl, pH 7,5; 100mM de NaCl; 1mM MgCl₂, 1 mM de CaCl₂, 1 mM MnCl₂; y 15 mM de 2-ME). Las proteínas unidas se eluyen con tampón de unión que contiene 15% α -Do-metilmanosido (Sigma, St. Louis, MO).

45 0131 El material de unión Con A-Sepharose es dializado primero contra 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, y NaCl 150 mM y luego aplicado a una columna Mono Q y eluido mediante un gradiente de 150 a 400 mM de NaCl. Las

fracciones acumuladas se concentran y se aplican sobre la columna de Superose 12 (Pharmacia). Las fracciones que contienen grp170 homogéneos se recogen.

0132 Alternativamente, GRP170 o GRP170-proteína pueden purificarse mediante cualquier método de purificación de inmutafinidad conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar columna scFv GRP170 específica. (Ver Arnold-Schild et al., Cancer Research, 2000, 60(15):4175-4178. Aunque Arnold-Schild describe una columna scFv gp96-específica, una columna scFv Hsp170 específica puede ser producido por el método equivalente). A modo de ejemplo pero sin limitación, la purificación utilizando columna scFv Hsp170 específica puede llevarse a cabo como sigue: scFv anti-Hsp170 están acoplados a Sepharose CNBr-activada. Las muestras que contienen complejo Hsp170 o Hsp170-proteína se aplican a la columna scFv anti-Hsp170. Después de lavado abundante con PBS, Hsp170 o Hsp170-proteína puede ser eluida con PBS, 1.3 M NaCl, o fosfato de sodio 10mM (pH 7,2).

5.1.6 Expresión Recombinante de Hsps

0133 Pueden usarse métodos conocidos en la materia para producir recombinantemente Hsps. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de choque térmico se puede insertar en un vector de expresión para la propagación y la expresión en células huésped.

0134 Un constructo de expresión, tal como se utiliza aquí, se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica una HSP operativamente asociada con una o más regiones reguladoras que permite la expresión de la HSP en una célula huésped apropiada. "Operativamente asociada" se refiere a una asociación en la que las regiones reguladoras y la secuencia HSP a expresar se unen y se colocan de tal manera como para permitir la transcripción y, finalmente, la traslación.

0135 Las regiones reguladoras necesarias para la transcripción de la HSP pueden ser proporcionadas por el vector de expresión. Un codón de iniciación de traslación (ATG) también puede proporcionarse si la secuencia del gen HSP carente de su codón de iniciación cognado va a expresarse. En un sistema constructo-huésped compatible, factores de transcripción celular, tales como la ARN polimerasa, se unen a las regiones reguladoras en el constructo de expresión para efectuar la transcripción de la secuencia de HSP modificada en el organismo huésped. La naturaleza precisa de las regiones reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar de célula huésped a célula huésped. Generalmente, se requiere un promotor que es capaz de unirse a la ARN polimerasa y promover la transcripción de una secuencia de ácido nucleico operativamente asociada. Tales regiones reguladoras pueden incluir las secuencias 5' no codificantes implicadas en la iniciación de la transcripción y la traslación, tales como caja TATA, secuencia de nivelación, secuencia CAAT, y similares. La región no codificante 3' para la secuencia de codificación puede contener secuencias reguladoras de terminación transcripcional, tales como terminadores y sitios de poliadenilación.

0136 Con el fin de unir secuencias de ADN con funciones reguladoras, tales como promotores, a la secuencia del gen HSP o para insertar la secuencia del gen HSP en el sitio de clonación de un vector, pueden ligarse enlazadores o adaptadores que proporcionan los apropiados sitios de restricción compatibles a los extremos de los ADNc mediante técnicas bien conocidas en la materia (Wu et al., 1987, Methods in Enzymol, 152:343-349). La escisión con una enzima de restricción puede ser seguida por modificación para crear extremos romos por digestión posterior o llenado de términos de ADN de cadena simple antes del ligado. Alternativamente, un sitio de enzima de restricción deseado puede ser introducido en un fragmento de ADN mediante la amplificación del ADN mediante uso de PCR con cebadores que contienen el sitio de restricción enzimática deseado.

0137 Un constructo de expresión que comprende una secuencia HSP operativamente asociada con regiones reguladoras se puede introducir directamente en células huésped adecuadas para la expresión y producción de complejos HSP-péptido sin clonación adicional. Ver por ejemplo, la Patente U.S. 5,580,859. Los constructos de expresión pueden contener también secuencias de ADN que facilitan la integración de la secuencia de HSP en el genoma de la célula huésped, por ejemplo, mediante recombinación homóloga. En este caso, no es necesario emplear un vector de expresión que comprende un origen de replicación adecuado para células huésped apropiadas con el fin de propagar y expresar la HSP en las células huésped.

0138 Una variedad de vectores de expresión pueden ser utilizados, incluyendo, pero no limitados a, plásmidos, cósmidos, fagos, fagémidos o virus modificados. Típicamente, tales vectores de expresión comprenden un origen funcional de replicación para la propagación del vector en una célula huésped apropiada, uno o más sitios de endonucleasa de restricción para inserción de la secuencia del gen HSP, y uno o más marcadores de selección. El vector de expresión debe ser utilizado con una célula huésped compatible que se puede derivar de un organismo procariota o eucariota incluyendo pero no limitado a bacterias, levaduras, insectos, mamíferos y humanos.

0139 La secuencia codificante de una proteína de choque térmico también se puede alterar mediante la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa. La glicosilación de polipéptidos es típicamente N-enlazada u O-enlazada. El término "N-enlazada" se refiere a la unión de la fracción carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática de la fracción carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. El término "glicosilación O-enlazada" se refiere a la unión de uno de los azúcares tales como la N-acetilgalactosamina, galactosa, xilosa o de un ácido hidroxilamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

0140 La adición de sitios de glicosilación puede conseguirse por diversos medios. Por ejemplo, la alteración puede ser hecha por los cambios en el nivel del ADN, especialmente por mutación del ADN que codifica una proteína o péptido interesadas en bases preseleccionadas de forma que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados. La mutación(es) del ADN puede hacerse usando métodos descritos en la Patente U.S. 5,364,934.

0141 Para producción de alto rendimiento a largo plazo de Hsp o complejos Hsp-proteína adecuadamente procesados, se prefiere expresión estable en células de mamífero. Las líneas celulares que expresan establemente Hsp o complejos Hsp-proteína pueden ser diseñadas mediante un vector que contiene un marcador seleccionable. A modo de ejemplo pero no de limitación, después de la introducción de los constructos de expresión, las células diseñadas se pueden dejar crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el constructo de expresión confiere resistencia a la selección y óptimamente permite a las células integrar establemente el constructo de expresión en sus cromosomas y crecer en cultivo y ser expandida en líneas celulares. Dichas células pueden ser cultivadas durante un largo período de tiempo mientras HSP se expresa de forma continua.

0142 Las células recombinantes pueden ser cultivadas en condiciones estándar de temperatura, tiempo de incubación, densidad óptica y composición de medio. Sin embargo, las condiciones para el crecimiento de las células recombinantes pueden ser diferentes de aquéllas para la expresión de HSPs y proteínas antigénicas. Condiciones de cultivo y medio modificadas pueden también utilizarse para mejorar la producción de la Hsp. Por ejemplo, las células recombinantes que contienen HSPs con sus promotores afines pueden estar expuestas al calor u otro estrés ambiental, o estrés químico. Cualquier técnica conocida en la materia puede aplicarse para establecer las condiciones óptimas para producir HSP o complejos HSP-proteína.

5.1.7 Síntesis de Péptidos

0143 Una alternativa a la producción de Hsp por técnicas recombinantes es la síntesis de péptidos. Por ejemplo, un Hsp entera, o un péptido correspondiente a una porción de una Hsp pueden ser sintetizados mediante el uso de un sintetizador de péptidos. Puede usarse síntesis de péptidos convencional u otros protocolos sintéticos bien conocidos en la materia.

0144 Los péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de una HSP o una porción de la misma pueden ser sintetizados por síntesis de péptidos en fase sólida utilizando procedimientos similares a los descritos por Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc., 85:2149. Durante la síntesis, los aminoácidos N- α -protegidos que tienen cadenas laterales protegidas se añaden escalonadamente a una cadena polipeptídica en crecimiento unida por

su C-terminal y a un soporte insoluble polimérico es decir, perlas de poliestireno. Los péptidos se sintetizan ligando un grupo amino de un aminoácido N- α -desprotegido a un grupo α -carboxilo de un aminoácido N- α -protegido que ha sido activado por reacción con un reactivo tal como dicitohexilcarbodiimida. La unión de un grupo amino libre al carboxilo activado lleva a la formación del enlace peptídico. Los grupos n- α -protectores más comúnmente utilizados incluyen Boc que es inestable al ácido y Fmoc que es inestable a base. Los detalles de las químicas, resinas, grupos protectores, aminoácidos protegidos y reactivos apropiados son bien conocidos en la materia y por ello no se discuten en este documento en detalle (Ver, Atherton, et al., 1989, Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press y Bodanszky, 1993, Química de Péptidos, Un Libro Práctico, 2da Ed., Springer-Verlag).

0145 Uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa también se pueden añadir durante la síntesis. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una proteína o péptido interesada puede alterarse de forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptido (para sitios de glicosilación N-enlazados) descritos en la sección 5.1.6. La alteración también puede hacerse mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia nativa (para los sitios de glicosilación O-enlazados).

0146 La purificación de la Hsp resultante se realiza utilizando procedimientos convencionales, tales como HPLC preparativa utilizando permeación de gel, partición y / o cromatografía de intercambio iónico. Las matrices y tampones adecuados son bien conocidos en la materia y por tanto no se describen en este documento en detalle.

5.2 Moléculas Antigénicas

0147 Las subsecciones siguientes proporcionan una visión general de las proteínas (incluyendo péptidos y polipéptidos) que son útiles como componentes antigénicos/inmunogénicos de los complejos moleculares de la invención, y cómo dichas proteínas pueden ser identificadas, por ejemplo, para su uso en la expresión recombinante de los péptidos por complejación in vitro de HSPs y Moléculas Antigénicas. Sin embargo, en la práctica de la presente invención, la identidad de la Molécula Antigénica(s) del complejo molecular no necesita ser conocida, por ejemplo, cuando el complejo HSP/péptido se purifica directamente de una célula cancerosa o de un tejido infectado con un patógeno.

0148 Epítopos antigénicos de una Molécula Antigénica pueden identificarse utilizando métodos conocidos en la técnica. Como aquí se usa, un "epítipo" se refiere a una región de un péptido antigénico que liga o se prevé que ligue un anticuerpo o molécula de histocompatibilidad importante (MHC) de un sujeto. Preferiblemente, el epítipo, al unirse a la molécula MHC, estimula in vivo una respuesta inmune al péptido antigénico. Los péptidos de la presente invención contienen epítopos que se prevé que sean capaces de ligar moléculas MHC seleccionadas e inducir una respuesta inmune. Los epítopos péptidos antigénicos de la invención comprenden residuos conservados implicados en ligar proteínas de unión codificadas por alelos de MHC. Los epítopos peptídicos antigénicos previstos para enlazar moléculas MHC de clase I son típicamente entre 8 a 10 residuos, mientras que los epítopos antigénicos peptídicos previstos para enlazar moléculas MHC de clase II están normalmente en el intervalo de 10 a 20 residuos.

0149 Los ejemplos no limitantes de alelos de MHC específicos humanos que se predice que enlaza péptidos antigénicos de la invención incluyen las moléculas de Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA) siguientes: HLA-A1, HLA-A201, HLA-A203, HLA-A3, HLA-A2402, HLA -A26, HLA-B702, HLA-B8, HLA-B1510, HLA-B2705, HLA-B2709, HLA-B4402, y HLA-B5101 (Rammensee, et al., Inmunogenética, 41, 178-228, 1995). La capacidad para enlazar moléculas MHC se puede medir por una variedad de maneras diferentes, como por inhibición de la presentación de antígenos (Sette, et al., J. Immunol. 141:3893, 1991), en ensayos in vitro de conjunto (Townsend, et al., Cell. 62:285, 1990), y ensayos basados en FACS utilizando células mutadas, como RMA.S (Melief, et al., Eur. J. Immunol. 21:2963, 1991).

0150 En algunas realizaciones, la Molécula Antigénica es una glicoproteína, y forma oligómeros en presencia de lectina. En otras realizaciones, la Molécula Antigénica no es una glicoproteína (pero un miembro diferente

del complejo es una glicoproteína). En algunas realizaciones, la Molécula Antigénica es aislada de lisados celulares. En algunas realizaciones, las Moléculas Antigénicas son sintetizadas. En algunas realizaciones, una Molécula Antigénica está modificada a una glicoproteína, por ejemplo, mediante la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa de la Molécula Antigénica seguida por la adición de hidratos de carbono. Ver, por ejemplo, Scott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:5398-5402 (1992).

5.2.1 Aislamiento de Componentes Antigénicos/Inmunogénicos

0151 Se ha encontrado que proteínas antigénicas (incluyendo péptidos y polipéptidos) y/o componentes pueden ser eluidos de complejos Hsp ya sea en presencia de ATP o bajo pH. Estas condiciones experimentales se pueden utilizar para aislar proteínas y/o componentes antigénicos de células que pueden contener determinantes antigénicos potencialmente útiles. Una vez aislada, la secuencia de aminoácidos de cada proteína antigénica puede determinarse usando metodologías convencionales de secuenciación de amino ácidos. Dichas moléculas antigénicas pueden entonces producirse por síntesis química o métodos recombinantes, purificadas, y complejadas con Hsps *in vitro* para formar los complejos Hsp de la invención.

0152 De manera similar, se ha encontrado que proteínas potencialmente inmunogénicas puede ser eluidas a partir de complejos MHC-proteína utilizando técnicas bien conocidas en la materia (Falk, K. et al., 1990 Nature 348:248-251; Elliott, T. et al., 1990, Nature 348:195-197; Falk, K. et al., 1991, Nature 351:290-296).

0153 Así, pueden aislarse proteínas potencialmente inmunogénicas o antigénicas de complejos Hsp-proteína endógenos o complejos MHC-proteína endógenos para uso posteriormente como Moléculas Antigénicas, por complejación *in vitro* a una glicoproteína, por ejemplo, una proteína de choque térmico glicosilada, para formar los complejos moleculares de la invención. Protocolos ilustrativos para aislar péptidos y/o componentes antigénicos de estos complejos son conocidos en la materia y se describen más adelante.

5.2.2 Péptidos de Complejos HSP-Péptido

0154 Dos métodos se pueden utilizar para eluir el péptido de un complejo Hsp-péptido.

0155 Un enfoque implica incubar el complejo Hsp-péptido en presencia de ATP. El otro enfoque implica incubar los complejos en un tampón de pH bajo.

0156 Brevemente, el complejo de interés se centrifuga a través de un conjunto Centricon 10 (Millipore) para eliminar cualquier material de bajo peso molecular ligeramente asociado con el complejo. La fracción de alto peso molecular puede ser eliminada y analizada por SDS-PAGE, mientras que la de bajo peso molecular puede ser analizada por HPLC como se describe a continuación. En el protocolo de incubación ATP, el complejo péptido-proteína de estrés en la fracción de alto peso molecular se incuba con 10mM de ATP durante 30 minutos a temperatura ambiente. En el protocolo de pH bajo (por ejemplo, un pH de 1, 2, 3, 4, 5 o 6), se añade ácido acético o ácido trifluoroacético (TFA) al complejo proteína de estrés -péptido para dar una concentración final de 10% (vol/vol) y la mezcla se incuba a temperatura ambiente o en un baño de agua hirviendo o a cualquier temperatura intermedia, por 10 minutos (Ver, Van Bleek, et al., 1990, Nature 348:213-216; y Li, et al., 1993, EMBO Journal 12:3143-3151).

0157 Las muestras resultantes se centrifugan a través de un conjunto Centricon 10 como se ha mencionado anteriormente. Las fracciones de alto y bajo peso molecular se recuperan. Los complejos de alto peso molecular proteína de estrés-péptido restantes pueden ser re-incubados con ATP o pH bajo (por ejemplo, un pH de 1, 2, 3, 4, 5 o 6) para eliminar cualquier péptidos restante.

0158 Las fracciones de bajo peso molecular resultantes son reunidas, concentradas por evaporación y disueltas en TFA 0.1%. El material disuelto es entonces fraccionado por cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (HPLC) utilizando por ejemplo una columna C18 Vydac de fase inversa equilibrada con TFA 0.1%. El material ligado se eluye a continuación con un caudal de aproximadamente 0.8 ml/min desarrollando la columna con un gradiente lineal de acetonitrilo de 0% a 80 en TFA 0.1%. La elución de los péptidos puede ser controlada por OD210 y las fracciones que contienen los péptidos recogidas.

5.2.3 Péptidos de Complejos MHC-Péptido

0159 El aislamiento de péptidos potencialmente inmunogénicos de moléculas MHC es bien conocido en la materia y por tanto no se describe aquí en detalle (Ver, Falk et al., 1990, Nature 348:248-251; Rotzsche et al., 1990, Nature 348: 252-254; Elliott et al., 1990, Nature 348:191-197; Falk et al., 1991, Nature 351:290-296; Demotz et al., 1989, Nature 343:682-684; Rotzsche et al., 1990, Science 249:283-287).

0160 Brevemente, los complejos MHC-péptido pueden ser aislados por un procedimiento convencional de inmunoafinidad. Los péptidos pueden entonces ser eluidos a partir del complejo MHC-péptido incubando los complejos en presencia de aproximadamente 0.1% de TFA en acetonitrilo. Los péptidos eluidos pueden ser fraccionados y purificados mediante HPLC en fase inversa, como antes.

0161 Las secuencias de aminoácidos de los péptidos eluidos se pueden determinar bien por técnicas manuales o automáticas de secuenciación de aminoácidos bien conocidas en la materia. Una vez que la secuencia de aminoácido de un péptido potencialmente protector se ha determinado el péptido puede ser sintetizado en cualquier cantidad deseada mediante síntesis de péptidos convencional u otros protocolos bien conocidos en la materia.

0162 Los péptidos que tienen la misma secuencia de aminoácidos como los aislados anteriormente pueden ser sintetizados por síntesis de péptidos en fase sólida utilizando procedimientos similares a los descritos por Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc., 85:2149. Durante la síntesis, se añaden escalonadamente aminoácidos N- α -protegidos que tienen cadenas laterales protegidas a una cadena polipeptídica en crecimiento unida por su extremo C-terminal y a un soporte polimérico insoluble es decir, perlas de poliestireno. Los péptidos son sintetizados mediante la vinculación de un grupo amino de un aminoácido N- α -desprotegido a un grupo α -carboxi de un ácido amino n- α -protegido que ha sido activado por reacción con un reactivo tal como diciclohexilcarbodiimida. La unión de un grupo amino libre al carboxilo activado lleva a la formación del enlace peptídico. Los más comúnmente utilizados grupos n- α -protectores incluyen Boc que es inestable a ácido y Fmoc que es inestable a base.

0163 Brevemente, el aminoácido N- α -protegido del C-terminal es unido primero a las perlas de poliestireno. El grupo N- α -protector es luego eliminado. El grupo α -amino desprotegido se acopla al grupo α -carboxilato activado del siguiente aminoácido N- α -protegido. El proceso se repite hasta que el péptido deseado es sintetizado. Los péptidos resultantes son luego escindidos del soporte polimérico insoluble y las cadenas laterales de aminoácidos desprotegidas. Los péptidos más largos pueden ser obtenidos por condensación de fragmentos peptídicos protegidos. Los detalles apropiados de químicas, resinas, grupos protectores, aminoácidos protegidos y reactivos son bien conocidos en la técnica y por ello no se discuten aquí en detalle (Véase, Atherton, et al., 1989, Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, y Bodanszky, 1993, Peptide Chemistry, Un Libro Práctico, 2da Ed., Springer-Verlag).

0164 La purificación de los péptidos resultantes se realiza utilizando procedimientos convencionales, tales como HPLC preparativa utilizando permeación de gel, partición y/o cromatografía de intercambio iónico. La elección de matrices y tampones apropiados es bien conocida en la materia y por tanto no se describe aquí en detalle.

5.2.4 Moléculas Antigénicas Exógenas

0165 Las moléculas que muestran la antigenicidad de un antígeno conocido de un agente patógeno o de un antígeno específico de tumor o asociado a tumor de un tipo de cáncer, por ejemplo antígenos o porciones antigénicas de los mismos, pueden ser seleccionadas para su uso como moléculas antigénicas, para la complejación de glicoproteína y/o lectina, de entre los conocidos en la materia o determinados por inmunoensayo para ser capaces de unirse a anticuerpos o moléculas MHC (antigenicidad) o generar respuesta inmune (inmunogenicidad). Para determinar la inmunogenicidad y antigenicidad mediante la detección de unión a anticuerpo, diversos inmunoensayos conocidos en la técnica pueden ser utilizados, incluyendo pero no limitado a sistemas de ensayo competitivos y no competitivos utilizando técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), inmunoensayos "sandwich", ensayos

inmunoradiométricos, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in vivo* (utilizando etiquetas de oro coloidal, de enzima o de radioisótopos, por ejemplo), Western blots, reacciones de inmunoprecipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de gel de aglutinación, ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación de complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A, y ensayos de inmunoelectroforesis, etc. En una realización, la unión del anticuerpo se detecta detectando de una etiqueta en el anticuerpo principal. En otra realización, el anticuerpo principal se detecta detectando la unión de un anticuerpo secundario o reactivo con el anticuerpo principal. En una realización adicional, el anticuerpo secundario se etiqueta. Muchos medios son conocidos en la materia para detectar la unión en un inmunoensayo y se prevé para uso. En una realización para detectar inmunogenidad, las respuestas mediadas por células T pueden ser ensayadas por métodos estándar, por ejemplo, en ensayos de citotoxicidad *in vitro* o en ensayos de hipersensibilidad *in vivo* de tipo retardado.

0166 Antígenos potencialmente útiles o sus derivados para su uso como Moléculas Antigénicas también pueden ser identificados por varios criterios, tales como la participación del antígeno en la neutralización de la infectividad de un patógeno (en la que se desea tratar o prevenir la infección por dicho patógeno) (Norrby, 1985, Resumen, en Vacunas 85, Lerner et al. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, pp. 388-389), especificidad de tipo o grupo, reconocimiento mediante antisueros o células inmunes de los pacientes, y/o la demostración de los efectos protectores de antisueros o células inmunes específicas para el antígeno. Además, cuando se desea tratar o prevenir una enfermedad causada por patógeno, el epítipo codificado del antígeno, preferentemente, debería mostrar un grado pequeño o nulo de variación antigénica en el tiempo o entre diferentes aislados del mismo patógeno.

0167 Preferiblemente, cuando se desea tratar o prevenir el cáncer, se usan antígenos específicos de tumor (es decir, expresados en células tumorales) o asociados a tumor (es decir, relativamente sobreexpresados en células tumorales) o fragmentos o derivados de los mismos. Por ejemplo, dichos antígenos específicos de tumor o asociados a tumor incluyen pero no se limitan al antígeno KS 1/4 pan-carcinoma (Pérez y Walker, 1990, J. Immunol. 142:3662-3667; Bumal, 1988, Hybridoma 7(4) :407-415); antígeno de carcinoma de ovario (CA125) (Yu et al., 1991, Cancer Res. 51(2):468-475); fosfato de ácido prostático (Tailer, et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18(16): 4928); antígeno específico de próstata (Henttu y Vihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 160(2):903-910; Israeli, et al., 1993, Cancer Res. 53:227-230); antígeno p97 asociado a melanoma (Estin, et al., 1989, J. Natl. Cancer Inst. 81(6):445-446); antígeno gp75 de melanoma (Vijayasardahl, et al., 1990, J. Exp. Med. 171(4):1375-1380); antígeno de melanoma de alto peso molecular (Natali, et al., de 1987, Cancer 59:55-63) y antígeno prostático específico de membrana. Otros antígenos exógenos que pueden ser complejados a una glicoproteína incluyen porciones o proteínas que están mutados a una frecuencia alta en las células cancerosas, tales como oncogenes (por ejemplo, ras, en particular mutantes de ras con mutaciones de activación, que sólo se producen en cuatro residuos aminoácidos (12, 13., 59 o 61) (Gedde-Dahl et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24(2):410-414)) y genes supresores tumorales (por ejemplo, p53, para el cual ha sido identificada una variedad de antígenos peptídicos p53 mutantes o polimórficos capaces de estimular una respuesta citotóxica a células T (Gnjatic et al., 1995, Eur. J. Immunol. 25(6):1638-1642).

0168 En una realización específica, un antígeno o un fragmento o derivado del mismo específico para un tumor se selecciona para a complejar a HSP para formar un complejo HSP-antígeno para oligomerización y luego administración a un paciente que tiene tal tumor.

0169 Preferiblemente, cuando se desea tratar o prevenir enfermedades víricas, se utilizan moléculas que comprenden epítomos de virus conocidos. Por ejemplo, tales epítomos antigénicos se pueden preparar a partir de virus que incluyen, pero no se limitan a, hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, influenza, varicela, adenovirus, herpes simple tipo I (HSV-I), herpes simple tipo II (VHS-II), peste bovina, rinovirus, echovirus, rotavirus, virus respiratorio sincitial, virus del papiloma, virus de la papova, citomegalovirus, echinovirus, arbovirus, huntavirus, virus Coxsackie, virus de parotiditis, el virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la polio, virus de inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I), y virus de inmunodeficiencia humana tipo II (VIH-II). Preferiblemente, cuando se desea tratar o prevenir infecciones bacterianas, se utilizan moléculas que comprenden epítomos de bacterias conocidas. Por ejemplo, tales epítomos antigénicos se pueden preparar a

partir de bacterias, incluyendo pero no limitado a, micobacterias de rickettsia, micoplasma, neisseria y legionella.

0170 Preferiblemente, cuando se desea tratar o prevenir infecciones por protozoos, se utilizan moléculas que comprenden epítomos de protozoos conocidas. Por ejemplo, tales epítomos antigénicos se pueden preparar a partir de protozoos, incluyendo pero no limitado a, leishmania, kokzidioa, y tripanosoma.

0171 Preferiblemente, cuando se desea tratar o prevenir infecciones parasitarias, se utilizan moléculas que comprenden epítomos de parásitos conocidas. Por ejemplo, tales epítomos antigénicos puede ser de parásitos, incluyendo pero no limitado a, clamidia y rickettsia.

5.3 Producción In Vitro de Complejos de Hsp/ Molécula Antigénica

0172 En una realización en la que no se emplean complejos específicos de Hsps y Moléculas Antigénicas con las que están asociadas de forma endógena *in vivo*, los complejos de Hsps a moléculas antigénicas se producen *in vitro*. Como se apreciará por los expertos en la materia las Moléculas Antigénicas ya sea aisladas por los procedimientos antes mencionados o sintetizadas químicamente o producidas recombinantemente pueden ser reconstituídas con una variedad de proteínas de estrés purificadas naturales o recombinantes *in vitro* para generar complejos inmunogénicos no covalentes proteína de estrés-Molécula Antigénica. Alternativamente, los antígenos exógenos o antigénicos o fragmentos inmunogénicos o derivados de los mismos pueden ser complejados a proteínas de estrés para uso en vacunas inmunoterapéuticas o profilácticas de la invención. Un protocolo ejemplar preferido para complejar *in vitro* una proteína de estrés y una Molécula Antigénica se discute a continuación.

0173 Antes de la complejación, las Hsps se tratan previamente con ATP o pH bajo (por ejemplo, un pH de 1, 2, 3, 4, 5 o 6) para eliminar cualquier péptido que puede estar asociado con la Hsp de interés. Cuando se utiliza el procedimiento de ATP, el exceso de ATP se retira de la preparación mediante la adición de apiranasas como se describe por Levy, et al., 1991, Cell 67:265-274. Cuando se utiliza el procedimiento de bajo pH, el tampón se reajusta a pH neutro mediante la adición de reactivos modificadores del pH.

0174 Las Moléculas Antigénicas (1µg) y la Hsp pretratada (9µg) se mezclan para dar aproximadamente una proporción molar de 5 Molécula Antigénica 5: 1 proteína de estrés. A continuación, la mezcla se incuba durante 15 minutos a 3 horas de 4° a 45°C en un tampón de unión adecuado tal como uno que contiene fosfato de sodio 20mM, pH 7.2, NaCl 350mM, MgCl₂ 3mM y fenil metil sulfonil fluoruro 1mM (PMSF). Las preparaciones se centrifugan a través de un conjunto Centricon 10 (Millipore) para eliminar cualquier péptido no unido. La asociación de los péptidos con las proteínas del estrés se puede ensayar mediante SDS-PAGE. Este es el método preferido para complejación *in vitro* de péptidos aislados de complejos MHC-péptido de péptidos disociados de complejos endógenos HSP-péptido.

0175 En una realización alternativa de la invención, preferida para producir complejos de Hsp70 a Moléculas Antigénicas exógenas tales como proteínas, 5-10 microgramos de Hsp purificada se incuban con iguales cantidades molares de la Molécula Antigénica en tampón de 20mM de fosfato sódico pH 7.5, 0.5 M de NaCl, 3mM MgCl₂ y ADP 1mM en un volumen de 100 microlitros a 37°C durante 1 h. Esta mezcla de incubación se diluye a 1 ml en tampón fosfato salino.

0176 En una realización alternativa de la invención, preferida para la producción de complejos de gp96 o hsp90 a péptidos, 5-10 microgramos de gp96 o hsp90 purificada se incuban con cantidades equimolares o en exceso del péptido antigénico en un tampón adecuado tal como uno que contiene 20mM de tampón de fosfato de sodio pH 7.5, 0.5 M de NaCl, MgCl₂ 3mM a 37-65°C durante 5-20 minutos. Esta mezcla de incubación se deja enfriar a temperatura ambiente y se centrifuga una o más veces si es necesario, mediante un conjunto Centricon 10 (Millipore) para eliminar cualquier péptido no unido.

0177 Después de la complejación, los complejos inmunogénicos proteína de estrés-Molécula Antigénica se pueden opcionalmente ensayar *in vitro* utilizando por ejemplo el ensayo mezclado de célula diana de linfocito (MLTC) descrito a continuación. Una vez que los complejos inmunogénicos se han aislado pueden ser

opcionalmente caracterizados además en modelos animales utilizando los protocolos de administración y excipientes preferidos discutidos a continuación.

0178 Como una alternativa a los complejos no-covalentes de Hsps y Moléculas Antigénicas, las Moléculas Antigénicas pueden estar covalentemente unidas a Hsps antes de la administración de acuerdo con los métodos de la presente invención. Los complejos Hsp-Molécula Antigénica son preferentemente reticulados después de su purificación de células o tejidos que se describen en las Secciones 5.1.1. a 5.1.4. En una realización, las Hsps se acoplan covalentemente a Moléculas Antigénicas por reticulación química. Los métodos químicos de reticulación son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, en una realización preferida, puede usarse la reticulación con glutaraldehído. La reticulación con glutaraldehído se ha utilizado para la formación de complejos covalentes de péptidos y HSPs (ver Barrios et al., 1992, Eur. J. Immunol. 22: 1365-1372). Preferiblemente, 1-2 mg de complejo Hsp-Molécula Antigénica se reticulan en presencia de 0.002% de glutaraldehído durante 2 horas. El glutaraldehído es eliminado por diálisis contra tampón fosfato salino (PBS) durante la noche (Lussow et al., 1991, Eur. J. Immunol. 21: 2297-2302).

0179 En otra realización, la Hsp y el antígeno(s) específico están reticulados por reticulación ultravioleta (UV).

0180 En otra realización, se producen proteínas de fusión recombinantes, que constan de una secuencia de proteína de choque térmico y una secuencia de péptido antigénico. Para producir dicha proteína de fusión recombinante, se construye un vector de expresión utilizando secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de choque térmico fusionada a secuencias que codifican un antígeno, utilizando métodos recombinantes conocidos en la materia, tales como los descritos en la Sección 5.1.6., arriba. Fusiones de Hsp-péptidos antigénicos son luego expresadas y aisladas. Tales proteínas de fusión pueden ser utilizados para provocar una respuesta inmune (Suzue et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 94: 13146-51). Diseñando específicamente la porción de péptido antigénico de la molécula, tales proteínas de fusión pueden utilizarse para provocar una respuesta inmune y en inmunoterapia contra cáncer o enfermedades infecciosas.

5.4 Oligomerización de Complejos Biológicos Activos

0181 De conformidad con la presente invención, las moléculas de lectina o tipo lectina forman un complejo molecular con glicoproteínas inmunológica y/o biológicamente activas. En algunas realizaciones, la glicoproteína es una proteína de choque térmico. En algunas realizaciones, la glicoproteína no es una proteína de choque térmico. En algunas realizaciones, la glicoproteína es una Molécula Antigénica. En algunas realizaciones, la glicoproteína no es una Molécula Antigénica. En ciertas realizaciones, el complejo molecular puede comprender además una o más fracciones que no son una glicoproteína. En una realización específica, el complejo molecular comprende además una fracción antigénica. En una realización específica, el complejo molecular comprende una molécula de lectina asociada con una glicoproteína y una proteína de choque térmico. En otra realización, el complejo molecular comprende una lectina asociada con una glicoproteína, una proteína de choque térmico, y una Molécula Antigénica. En otra realización específica, el complejo molecular comprende una molécula de lectina asociada con la proteína de choque térmico glicosilada y una Molécula Antigénica, en donde dicha proteína de choque térmico glicosilada puede ser una proteína de choque térmico de origen natural (por ejemplo, gp96, GRP170, Calreticulin, y BIP (GRP78)), o una proteína de choque térmico de origen no natural que se convierte en una glicoproteína añadiendo uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en las secuencias de aminoácidos nativas que comprenden la proteína de choque térmico seguido por la adición de grupos carbohidrato. Un complejo de glicoproteína (por ejemplo, proteína de choque térmico) y Molécula Antigénica puede ser no covalente o covalente. Preferiblemente, una lectina se une covalentemente a una o más glicoproteínas o al complejo de glicoproteína (por ejemplo, proteína de choque térmico) y otra o más fracciones (por ejemplo, Moléculas Antigénicas). En una realización preferida, la molécula de lectina es una molécula de lectina de unión a manosa, incluyendo pero no se limita a, las que figuran en la Tabla 1. Más preferiblemente, la molécula de lectina de unión a manosa es Concanavalina A (Con A).

0182 En una realización preferida, el número de las lectinas presentes en un complejo molecular es mayor que el número de glicoproteínas presentes en el complejo molecular. En algunas realizaciones, la relación molar

entre glicoproteína y lectina es 3:1, 2:1, o 1:1. En una realización preferida, la lectina es Con A en forma de un tetrámero, y para cada molécula tetrámera Con A, hay tres, dos, o una glucoproteína(s) unida.

0183 Un complejo molecular de la invención se puede preparar por métodos diferentes. En ciertas realizaciones, el complejo molecular se forma *in vivo* y el complejo molecular se aísla de las células. En ciertas realizaciones, el complejo molecular se produce *in vitro* a partir de preparaciones purificadas de uno o más componentes del complejo molecular. Las técnicas que pueden usarse en la preparación del complejo molecular de la invención dependerán de la naturaleza del complejo. Ejemplos no limitativos de preparar componentes de un complejo molecular de la invención se dan en las secciones 5.1. - 5.3., *supra*. Pueden también aprovecharse otras técnicas que son bien conocidas en materia de purificación de proteínas, que incluyen pero no están limitadas a, separación por adsorción, por ejemplo, cromatografía, intercambio iónico, adsorbentes inorgánicos, adsorbentes hidrofóbicos, cromatografía de afinidad de metal inmovilizado, inmunoabsorbentes, cromatografía colorante de ligando, elución de afinidad de intercambiadores iónicos y otros adsorbentes; filtración en gel; métodos electroforéticos; partición en fase líquida, y ultrafiltración. Ver Scopes, 1994, PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS, PRINCIPIOS Y PRÁCTICA, 3ra Ed., Springer.

0184 Pueden añadirse lectinas en diversas etapas de preparación de un complejo molecular, por ejemplo, antes de, o posteriormente a, diferentes pasos de cromatografía utilizados para purificar las fracciones inmunológica y/o biológicamente activas (por ejemplo, complejos Hsp-proteína). Las lectinas pueden añadirse en diversas formas, tales como polvo o una solución líquida. Pueden usarse lectinas diferentes en combinación para preparar los oligómeros de la invención. Las lectinas también pueden ser reticuladas mediante métodos bien conocidos en la materia antes de añadir a una preparación molecular de la invención para promover la oligomerización. En algunas realizaciones, añadir lectinas es uno de los pasos en la purificación del complejo molecular. En algunas realizaciones, otros componentes del complejo molecular se preparan primero, y las lectinas son añadidas al producto final para promover la oligomerización del complejo molecular. En una realización preferida, el complejo molecular de la invención comprende una proteína de choque térmico, una Molécula Antigénica, y lectina, donde la cantidad de lectina añadida es suficiente para promover la oligomerización de la preparación, y para producir un producto(s) final en la que la cantidad de lectina presente en el producto(s) final en relación con la cantidad de proteína de choque térmico es igual o superior a 5ng, 10ng, 20ng, 30ng, 40ng, 50ng, 75ng, 100ng, o 200ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en el producto(s) final en relación con la cantidad de proteína de choque térmico es 40ng a 1000ng, 50ng a 1000ng, 50ng a 500ng, 100ng a 250ng, o 150ng a 200ng de lectina por microgramo de proteína de choque térmico. En algunas realizaciones, la cantidad de lectina añadida es suficiente para promover la oligomerización de la preparación y para producir un producto final o productos donde la cantidad de lectina presente en el producto(s) final en relación con la cantidad de proteína de choque térmico es igual o menor que 5ng por microgramo de proteína de choque térmico. Preferiblemente, la cantidad de lectina presente en el producto(s) final en relación con la cantidad de proteína de choque térmico es de entre 0.1ng a 5ng, 0.2ng a 4ng, 0.3ng a 3ng, 0.5ng a 2ng, o 0.1ng a 1ng de lectina por microgramo de glicoproteína.

0185 Cualquier ensayo conocido en la materia puede usarse para confirmar la oligomerización del complejo molecular. Por ejemplo, puede usarse perfilado SEC, en el que un complejo molecular oligomerizado se eluye en una fracción diferente en comparación con un complejo molecular no-oligomerizado en purificación en columna de exclusión por tamaño. (por ejemplo, ver sección 7).

0186 Cualquier ensayo conocido en la materia puede usarse para confirmar la presencia de la molécula de lectina en el oligómero, incluyendo pero no limitado a, cualquier método inmunobasado, tal como ELISA, radioinmunoensayos, inmunoensayos "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, ensayos de inmunodifusión, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de inmunoelectroforesis, etc. todos estos ensayos son bien conocidos en la materia y no se describen en detalle aquí. (para un ejemplo de ELISA Con A específico, ver sección 6).

0187 La correlación de oligomerización del complejo molecular a sus actividades *in vivo* e *in vitro* se puede demostrar por cualquier ensayo conocido en la materia incluyendo pero no limitado a, los ensayos que detectan la actividad biológica y / o inmunogenicidad de los complejos moleculares de la invención (tales como, pero no

limitados a, los descritos en la sección 5.5, *infra.*), ensayos que prueban las actividades *in vitro* de los complejos moleculares de la invención (tales como, pero no limitados a, ensayos de representación, por ejemplo, ensayo de representación CD71 *in vitro*, ensayo de representación Meth A *in vitro*, y ensayo de representación de antígeno CT26 *in vitro*, ver secciones de Ejemplo, *infra.*), y ensayos que prueban actividades *in vivo* de los complejos moleculares de la invención usando modelos animales (por ejemplo, ensayo de inhibición de tumor Meth A *in vivo*, ver secciones de Ejemplo, *infra.*). En una realización preferida, se usan el ensayo de representación o un ensayo de inhibición de tumor.

5.5 Determinación de la Inmunogenicidad de los Complejos Moleculares

0188 Opcionalmente, los complejos moleculares de la invención pueden ser ensayados para inmunogenicidad utilizando cualquier método conocido en la materia. A modo de ejemplo pero no de limitación, uno de los procedimientos siguientes puede ser utilizado.

5.5.1 El Ensayo MLTC

0189 Brevemente, se inyectan ratones con una cantidad del complejo molecular de la invención, utilizando cualquier vía conveniente de administración. Como control negativo, otros ratones son inyectados con, por ejemplo, complejos moleculares que no comprenden glicoproteínas oligomerizadas. Células que se sabe que contienen antígenos específicos, por ejemplo células tumorales o células infectadas con un agente de una enfermedad infecciosa, pueden actuar como control positivo para el ensayo. Los ratones son inyectados dos veces, con 7-10 días de diferencia. Diez días después de la última inmunización, se extraen los bazo y se liberan los linfocitos. Los linfocitos liberados pueden ser re-estimulados posteriormente *in vitro* por adición de células muertas que expresan el antígeno de interés.

0190 Por ejemplo, 8×10^6 células de bazo inmunes pueden ser estimuladas con 4×10^4 células tratadas con mitomicina C o γ -irradiadas (5-10.000 rads) que contienen el antígeno de interés (o células transfectadas con un gen apropiado, como sea el caso) en 3ml de medio RPMI que contiene 10% de suero fetal de ternero. En algunos casos 33% del sobrenadante de cultivo mixto de linfocitos secundario puede ser incluido en el medio de cultivo como una fuente de factores de crecimiento de células T (Ver, Glasebrook, et al., 1980, J. Exp. Med. 151:876). Para probar la principal respuesta de células T citotóxicas después de la inmunización, las células del bazo pueden ser cultivadas sin estimulación. En algunos experimentos las células del bazo de ratones inmunizados también pueden ser re-estimuladas con células antigénicamente diferentes, para determinar la especificidad de la respuesta de células T citotóxicas.

0191 Seis días después, los cultivos se analizan para determinar la citotoxicidad en un ensayo de liberación de ^{51}Cr de 4 horas (Ver, Palladino, et al., 1987,b Cancer Res. 47:5074-5079 y Blachere, et al., 1993, J. Inmunoterapia 14:352 -356). En este ensayo, el cultivo de linfocitos mixtos se añade a una suspensión de células diana para dar diferentes relaciones efector:diana (E:T) (generalmente 1:1 a 40:1). Las células diana son pre-etiquetadas incubando 1×10^6 células diana en medio de cultivo que contiene 20 mCi ^{51}Cr /ml durante una hora a 37°C. Las células se lavan tres veces después del etiquetado. Cada punto de ensayo (relación E:T) se realiza por triplicado y los controles apropiados se incorporan para medir la liberación espontánea de ^{51}Cr (no linfocitos añadidos al ensayo) y 100% de liberación (células lisadas con detergente). Después de incubar las mezclas de células durante 4 horas, las células se peletizan por centrifugación a 200g durante 5 minutos. La cantidad de ^{51}Cr liberado en el sobrenadante se mide con un contador gamma. El porcentaje de citotoxicidad se mide como cpm en la muestra de ensayo menos cpm liberado espontáneamente, dividido por el total de cpm de detergente liberado menos cpm liberado espontáneamente.

0192 Con el fin de bloquear la cascada de MHC clase I se añade un sobrenadante de hibridoma concentrado derivado de células de hibridoma K-44 (un hibridoma de clase I anti-MHC) a las muestras de ensayo para una concentración final de 12,5%.

5.5.2 Ensayo de Proliferación de Células T CD4⁺

0193 Las células T primarias se obtienen del bazo, sangre fresca, o LCR y purificadas por centrifugación utilizando FICOLLAQUE PLUS (Pharmacia, Upsala, Suecia) esencialmente como se describe por Kruse y Sebal, 1992, EMBO J. 11: 3237-3244. Las células mononucleares de sangre periférica se incuban durante 7-10 días con un lisado de células que expresan una Molécula Antigénica. Células presentadoras de antígeno pueden, opcionalmente, ser añadidas al cultivo 24 a 48 horas antes del ensayo, con el fin de procesar y presentar el antígeno en el lisado. Las células se cosechan luego por centrifugación, y se lavan en medio RPMI 1640 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD). 5x10⁴ células T activadas/pocillo (PHA-blastos) están en medio RPMI 1640 conteniendo 10% de suero fetal bovino, 10 mM HEPES, pH 7.5, 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina G y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina en placas de 96 pocillos durante 72 horas a 37°C, pulsadas con 1 µCi ³H-timidina (DuPont NEN, Boston, MA)/pocillo durante 6 horas, cosechadas, y la radiactividad medida en un contador de centelleo TOPCOUNT (Packard Instrument Co., Meriden, Conn.).

5.5.3 Ensayo de Respuesta de Anticuerpos

0194 En una cierta realización de la invención, la inmunogenicidad de un complejo molecular de la invención que comprende glicoproteínas oligomerizadas se determina midiendo los anticuerpos producidos en respuesta a la administración con el complejo. En un modo de la realización, las placas de microtitulación (Placa Inmuno II de 96-pocillos, Nunc) se recubren con 50 µl/pocillo de una solución de 0.75 µg/ml de una forma purificada, no complejada del péptido antigénico utilizado en el complejo molecular (por ejemplo Aβ42) en PBS a 4°C durante 16 horas y a 20°C durante 1 hora. Los pocillos son vaciados y bloqueados con 200 µl PBS-T-BSA (PBS que contenía 0.05% (v/v) TWEEN 20 y 1% (p/v) de albúmina de suero bovino) por pocillo a 20°C durante 1 hora, luego se lava 3 veces con PBS-T. Cincuenta µl/pocillo de plasma o CSF de un animal (tal como un ratón modelo o un paciente humano) que ha recibido el complejo molecular de la invención se aplica a 20°C durante 1 hora, y las placas se lavan 3 veces con PBS -T. La actividad de anticuerpos anti-péptido se mide entonces calorimétricamente después de incubar a 20°C durante 1 hora con 50 µl/pocillo de inmunoglobulina de oveja anti-ratón o anti-humana, según proceda, conjugada con peroxidasa de rábano picante (Amersham) diluida 1:1500 en PBS-T-BSA y (después de 3 lavados PBS-T más como arriba) con 50 µl de una solución de sustrato o-fenilendiamina (OPD)-H₂O₂. La reacción se para con 150 µl de H₂SO₄ 2M después de 5 minutos y se determina la absorbancia en un fotómetro Kontron TR-210 (SLT Lab-instr., Zurich, Suiza) a 492 nm (ref. 620 nm).

5.5.4 Ensayo de Detección de Citoquinas

0195 La respuesta proliferativa de células T CD4⁺ a los complejos HSP de la invención se puede medir por detección y cuantificación de los niveles de citoquinas específicas. En una realización, por ejemplo, las citoquinas intracelulares se pueden medir utilizando un ensayo de detección IFN-γ para probar la inmunogenicidad de un complejo de la invención. En un ejemplo de este método, las células mononucleares de sangre periférica de un sujeto tratado con un complejo lectina-HSP-péptido son estimuladas con antígenos peptídicos de un tumor determinado o con antígenos peptídicos de un agente de enfermedad infecciosa. Las células son luego teñidas con anticuerpos etiquetados específicos de células T detectables por citometría de flujo, por ejemplo, anticuerpos anti-CD8 FITC-conjugados y anti-CD4PerCP-etiquetados. Después del lavado, las células son fijadas, permeabilizadas, y reaccionadas con anticuerpos etiquetados con tinte reactivos con IFN-γ (PE-anti-IFN-γ) humano. Las muestras son analizadas por citometría de flujo utilizando técnicas estándar.

0196 Alternativamente, puede usarse un inmunoensayo de filtro, el ensayo inmunospot ligado a enzimas (ELISPOT), para detectar las citocinas específicas que rodean una célula T. En una realización, por ejemplo, una placa de microtitulación con respaldo de nitrocelulosa está revestida con un anticuerpo primario purificado específico de citoquina, es decir, anti-IFN-γ, y la placa se bloquea para evitar fondo debido a unión no específica de otras proteínas. Una muestra de células mononucleares de sangre, que contienen células secretoras de citoquinas, es obtenida de un sujeto tratado con un complejo lectina-HSP-péptido, cuya muestra es diluida en los pocillos de la placa de microtitulación. Se añade un anticuerpo anti-citoquina secundario etiquetado, por ejemplo, marcado con biotina. El complejo anticuerpo citocina puede entonces ser detectado, es

decir, por estreptavidina conjugadas con enzima - las células secretoras de citoquina aparecerán como "puntos" por métodos de detección visuales, microscópicos, o electrónicos.

5.5.5 Ensayo de Tetrámero

5 0197 En otra realización, el ensayo " coloración de tetrámero " (Altman et al., 1996, Science 274: 94-96) puede ser utilizado para identificar antígenos específicos de células T. Por ejemplo, en una realización, una molécula MHC que contiene un antígeno peptídico específico, tal como un antígeno específico de tumor, es multimerizado para hacer tetrámeros peptídicos solubles y etiquetado, por ejemplo, por complejación con estreptavidina. El complejo MHC- antígeno péptido se mezcla luego con una población de células T obtenidas a partir de un sujeto tratado con un complejo lectina-HSP. Se utiliza luego biotina para teñir las células T que expresan el antígeno de interés, es decir, el antígeno específico de tumor.

5.6 Combinación con Inmunoterapia Adoptiva

15 Inmunoterapia adoptiva se refiere a un enfoque terapéutico para tratar cáncer o enfermedades infecciosas en el que se administran células inmunes a un huésped con el fin de que las células medien sea directa o indirectamente la inmunidad específica a células tumorales y/o componentes antigénicos o regresión del tumor o tratamiento de enfermedades infecciosas, como sea el caso. (Ver la patente U.S. 5,985,270, emitida el 16 de noviembre de 1999.) Como un paso opcional, de acuerdo con los métodos aquí descritos, las APC están sensibilizadas con el complejo molecular de la invención y se utilizan en inmunoterapia adoptiva.

20 0199 En una realización, las células presentadoras de antígeno (APC) para uso en inmunoterapia adoptiva están sensibilizadas con HSPs asociadas a lectina complejadas con proteínas antigénicas preparadas según los métodos aquí descritos. Los complejos pueden ser producidos complejando lectina-Hsp a proteínas antigénicas que se derivan de al menos 50% de las diferentes proteínas o al menos 100 proteínas diferentes presentes en células antigénicas o partículas víricas que expresan un determinante antigénico de un agente que causa la enfermedad infecciosa. Los complejos también pueden producirse por (a) someter una preparación de proteína derivada de células de dicho tipo de cáncer sea a la digestión con una proteasa o contacto con ATP, hidrócloruro de guanidinio, y/o ácido, para generar una población de péptidos antigénicos, y 25 (b) complejar la población de péptidos antigénicos a lectina-Hsp.

30 0200 En otra realización, la terapia mediante administración de péptidos antigénicos, HSP y lectinas complejados *in vitro* preparados por los métodos de la invención se pueden combinar con inmunoterapia adoptiva utilizando APC sensibilizadas por complejos HSP péptidos antigénicos preparados por cualquier método conocido en la materia (ver, por ejemplo, Patente U.S. 5,985,270) en el que los péptidos antigénicos muestran la antigenicidad deseada (por ejemplo, del tipo de cáncer o patógeno). Las APC sensibilizadas pueden ser administrada sola, en combinación con las proteínas, HSPs y lectinas complejadas *in vitro*, o antes o después de la administración de las proteínas, HSPs y lectinas complejadas. En particular, el uso de APC sensibilizadas para prevenir y tratar el cáncer puede comprender además administrar al sujeto una cantidad, 35 eficaz para dicho tratamiento o prevención, de complejos que comprenden lectina y proteína de choque térmico complejadas con proteínas antigénicas, donde dichos complejos fueron producidos como se describe anteriormente. De manera similar, el uso de APC sensibilizadas para tratar o prevenir un tipo de enfermedad infecciosa, puede comprender además administrar al sujeto una cantidad, eficaz para dicho tratamiento o prevención, de complejos que comprenden proteínas de choque térmico y proteínas antigénicas asociadas con 40 lectina.

0201 Además, el modo de administración de los complejos moleculares producidos *in vitro* de la invención puede ser variado, incluyendo pero no limitado a, por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa o intramuscular, aunque se prefiere la vía intradérmica. En otra realización específica, la inmunoterapia adoptiva por administración de células presentadoras de antígenos sensibilizadas con complejos hechos según la presente 45 invención puede ser combinada con terapia por administración de lectina asociada con complejos HSP-Molécula Antigénica preparados por cualquier método conocido en la materia (ver por ejemplo, la Patente U.S.

5,750,119, 5,837,251, 5,961,979, 5,935,576, publicaciones PCT WO 94/14976 o WO 99/50303) en el que las Moléculas Antigénicas muestran la antigenicidad deseada (por ejemplo, del tipo de cáncer o patógeno).

5.6.1 Obtención de Macrófagos y Células Presentadoras de Antígeno

5 0202 Las células presentadoras de antígeno, incluyendo pero no limitado a macrófagos, células dendríticas y células B, se obtienen preferentemente por producción *in vitro* de células madre y progenitoras de sangre periférica humana o de médula ósea, como se describe por Inaba, K., et al., 1992, J. Exp. Med., 176:1693-1702.

0203 APC pueden obtenerse por cualquiera de diversos métodos conocidos en la materia. En un aspecto preferido se usan macrófagos humanos, obtenidos de células sanguíneas humanas. A modo de ejemplo pero sin limitación, se pueden obtener macrófagos como sigue:

10 0204 Se aíslan células mononucleares de sangre periférica de un paciente (preferiblemente el paciente a tratar), por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque y se siembran en placas de cultivo de tejidos que son pre-recubiertas con suero del propio paciente o con otro suero humano AB+. Las células se incuban a 37°C durante 1 hora, luego las células no adherentes se separan por pipeteado. A las células adherentes que quedan en el plato, se añade (4°C) 1 mM EDTA frío en solución salina tamponada con fosfato y los platos se dejan a
15 temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células son cultivadas, lavadas con tampón de RPMI y suspendidas en tampón de RPMI. Un mayor número de macrófagos se puede obtener mediante incubación a 37°C con macrófagos-factor estimulante de colonias (M-CSF); puede obtenerse un número aumentado de células dendríticas mediante incubación con macrófagos-granulocitos-factor estimulante de colonias (GM-CSF) como se describe en detalle por Inaba, K., et al., 1992, J. Exp. Med., 176:1693-1702.

20 5.6.2 Sensibilización de Macrófagos y Células Presentadoras de Antígenos con Complejos Moleculares de la Invención

0205 Las APC se sensibilizan con complejos moleculares de la invención, preferiblemente incubando las células *in vitro* con los complejos. Las APC se sensibilizan con complejos que comprenden
25 glicoproteínas/glicopéptidos asociados con lectina y Moléculas Antigénicas por incubación *in vitro* con los complejos a 37°C durante 15 minutos a 24 horas. A modo de ejemplo pero no de limitación, 5×10^4 macrófagos pueden incubarse con la concentración deseada de Hsp, a partir de 150 µg/ml y titulando hacia abajo, a 37°C durante 15 minutos-24 horas en 1 ml de medio RPMI puro. Las células se lavan tres veces y se resuspenden en un medio fisiológico preferiblemente estéril, a una concentración conveniente (por ejemplo, 1×10^7 /ml) para inyección en un paciente. Preferiblemente, el paciente al que las APCs sensibilizadas se inyectan es el paciente
30 del que las APC se aislaron originalmente (realización autóloga).

0206 Opcionalmente, la capacidad de APC sensibilizadas para estimular, por ejemplo, linfocitos T citotóxicos (CTL) restringidos a clase I específicos de antígeno puede ser controlada por su capacidad para estimular CTLs para liberar factor de necrosis tumoral, y por su capacidad para actuar como dianas de estos CTLs.

5.6.3 Reinfusión de APC Sensibilizadas

35 0207 El complejo molecular-APC sensibilizadas se reinfunde en el paciente sistémicamente, preferiblemente por vía intravenosa, por procedimientos clínicos convencionales. Estas células activadas se reinfunden, preferentemente por administración sistémica en el paciente autólogo. Los pacientes reciben generalmente desde unos 10^6 a unos 10^{12} macrófagos sensibilizados, dependiendo de la afección del paciente. En algunos regímenes, los pacientes pueden recibir opcionalmente además una dosificación adecuada de un modificador
40 de respuesta biológica, incluyendo pero no limitado a las citoquinas IFN-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-6, TNF u otro factor de crecimiento de citoquinas.

5.7 Inmunoterapia Pasiva

0208 Las composiciones de la invención también se pueden utilizar para inmunoterapia pasiva contra cáncerES y enfermedades infecciosas. La inmunidad pasiva es la protección a corto plazo de un huésped, lograda por

administración de anticuerpo pre-formado dirigido contra un organismo heterólogo. Por ejemplo, pueden usarse composiciones de la invención que comprenden complejos HSP-péptido obtenidos de células infectadas con un organismo infeccioso y oligomerizados con moléculas de lectina para provocar una respuesta inmune en un sujeto, el suero retirado del sujeto también se puede utilizar para el tratamiento o prevención de una enfermedad que es causada por el organismo infeccioso en otro sujeto.

5.8 Prevención y Tratamiento de Enfermedades

0209 La presente invención proporciona además una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de una composición que comprende uno o más complejos moleculares para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad (por ejemplo, cáncer, enfermedades infecciosas, anemia, deficiencias de hormona de crecimiento, enfermedades de deficiencia de enzimas, afecciones de inmunosupresión, etc.), en donde cada complejo comprende una lectina asociada con una glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa. En una realización, la glicoproteína es una Molécula Antigénica. En una realización específica, el complejo comprende una lectina, una glicoproteína que es una Molécula Antigénica, y otra molécula, tal como una proteína de choque térmico, que puede o no estar glicosilada. En otra realización, la glicoproteína no es una Molécula Antigénica. En una realización específica, la glicoproteína es una proteína de choque térmico glicosilada. En otra realización, el complejo molecular de la invención comprende una lectina, una glicoproteína que no es una Molécula Antigénica, y una Molécula Antigénica (que puede o no puede ser una glicoproteína). En una realización específica, la Molécula Antigénica es una proteína (que incluye péptidos y polipéptidos) que muestra la antigenicidad de un antígeno de un tipo de cáncer o de un agente de una enfermedad infecciosa. Las composiciones pueden además comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal de granja, como un caballo, una gallina, una oveja o un cerdo. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal doméstico, como un pájaro, un perro o un gato. En una realización preferida, el sujeto es un humano.

0210 En una realización, "tratamiento" o "tratar" se refiere a una mejora de una enfermedad, o al menos un síntoma discernible de la misma. En otra realización, "tratamiento" o "tratar" se refiere a una mejora de al menos un parámetro físico medible asociado con una enfermedad, no necesariamente discernible por el sujeto. En otra realización, "tratamiento" o "tratar" se refiere a la inhibición de la progresión de una enfermedad, ya sea físicamente, por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible, fisiológicamente, por ejemplo, estabilización de un parámetro físico, o ambos. En otra realización, "tratamiento" o "tratar" se refiere a retrasar el comienzo de una enfermedad o trastorno.

0211 En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se administran a un sujeto como una medida preventiva contra una enfermedad. Como aquí se usa, "prevención" o "prevenir" se refiere a una reducción del riesgo de adquirir una enfermedad dada como cáncer o enfermedad infecciosa. En un modo de la realización, las composiciones de la presente invención se administran como una medida preventiva para un sujeto que tiene una predisposición genética a un cáncer. En otro modo de la realización, las composiciones de la presente invención se administran como una medida preventiva a un sujeto con exposición a agentes carcinógenos incluyendo pero no limitado a productos químicos y/o radiación, o a un sujeto con exposición a un agente de una enfermedad infecciosa.

0212 Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la administración de las composiciones de la invención conduce a una inhibición o reducción del crecimiento de células cancerosas o agentes infecciosos en lo menos 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 45%, al menos 40%, al menos 35%, al menos 30%, al menos 25%, al menos 20%, o al menos 10% con respecto al crecimiento en ausencia de dicha composición.

0213 Las composiciones preparadas por métodos descritos en este documento comprenden complejos de lectina asociados con glucoproteína(s), con preferencia proteína(s) de choque térmico. Las composiciones pueden comprender además una población de péptidos antigénicos (que pueden o no ser glicoproteínas). Las composiciones de la invención pueden ser utilizadas para inducir una reacción inflamatoria en el sitio del tumor

y, finalmente, pueden causar una regresión de la carga del tumor en los pacientes con cáncer tratados. Las composiciones de la invención pueden mejorar la inmunocompetencia del sujeto y provocar inmunidad específica frente a agentes infecciosos o inmunidad específica contra células pre-neoplásicas y neoplásicas. Las composiciones de la invención también pueden utilizarse para prevenir la aparición y la progresión de enfermedades infecciosas, y para inhibir el crecimiento y la progresión de células tumorales.

0214 Terapia de combinación se refiere al uso de los complejos moleculares de la invención con otra modalidad para prevenir o tratar una enfermedad, por ejemplo, cáncer, enfermedades infecciosas, anemia, deficiencias de hormona de crecimiento, enfermedades de deficiencia de enzimas, condiciones de supresión inmunológica. La administración de los complejos de la invención pueden aumentar el efecto de los agentes profilácticos o terapéuticos, tales como agentes anticancerígenos o antiinfecciosos, y viceversa. Preferiblemente, esta forma adicional de modalidad es una modalidad basada en no-lectina-HSP, es decir, esta modalidad no comprende sea HSP o lectina como un componente. Este enfoque se denomina comúnmente terapia de combinación, terapia adyuvante o terapia conjunta (los términos se utilizan aquí indistintamente). Con la terapia de combinación, se puede observar potencia aditiva o efecto terapéutico aditivo. También pueden esperarse resultados sinérgicos, donde la eficacia terapéutica es mayor que la aditiva. El uso de terapia de combinación también puede proporcionar mejores perfiles terapéuticos que la administración de la modalidad de tratamiento, o de los complejos de lectina-HSP por si solas. El efecto aditivo o sinérgico puede permitir que la dosis y/o frecuencia de dosificación de una o ambas modalidades se ajuste para reducir o evitar efectos no deseados o adversos.

0215 De acuerdo con la invención, pueden utilizarse complejos moleculares de la invención solos o en combinación con muchos tipos diferentes de modalidades de tratamiento. Algunas de esas modalidades son particularmente útiles para un tipo específico de cáncer o enfermedad infecciosa y se discuten en la Sección 5.8.1 y 5.8.2. Muchas otras modalidades tienen un efecto sobre el funcionamiento del sistema inmune y son aplicables en general a ambas enfermedades neoplásicas e infecciosas.

0216 En una realización, se utilizan complejos moleculares de la invención en combinación con uno o más modificadores de respuesta biológica para tratar cáncer o enfermedad infecciosa. Un grupo de modificadores de la respuesta biológica es las citoquinas. En una realización tal, una citoquina se administra a un sujeto que recibe complejos moleculares de la invención. En otra realización tal, los complejos moleculares se administran a un sujeto que recibe un agente quimioterapéutico en combinación con una citoquina. En diversas realizaciones, pueden usarse una o más citoquina (s) y se seleccionan del grupo que consiste de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IFN α , IFN β , IFN γ , TNF α , TNF β , G-CSF, GM-CSF, TGF- β , IL-15, IL-18, el GM-CSF, INF- γ , INF- α , SLC, proteína-2 endotelial de activación de monocitos (EMAP2), MIP-3 α , MIP-3 β , o un gen MHC, como HLA-B7. Además, otras citoquinas ejemplares incluyen otros miembros de la familia TNF, incluyendo pero no limitado a el ligando inductor de apoptosis relacionada con TNF- α (TRAIL), la citoquina inducida por la activación relacionada con TNF- α (TRANCE), inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF- α (TWEAK), ligando de CD40 (CD40L), linfotóxina alfa (LT- α), linfotóxina beta (LT- β), ligando OX40 (OX40L), ligando Fas (FasL), ligando CD27 (CD27L), ligando CD30 (CD30L), ligando 41BB (41BBL), APRIL, LIGHT, TL1, TNFSF16, TNFSF17 y AITR-L, o una parte funcional de los mismos. Ver, por ejemplo, Kwon et al., 1999, Curr. Opin. Immunol. 11:340-345 para una revisión general de la familia de TNF. Preferiblemente, los complejos moleculares se administran antes de las modalidades de tratamiento. En una realización específica, los complejos de la invención se administran a un sujeto que recibe ciclofosfamida en combinación con IL-12 para el tratamiento del cáncer.

0217 En otra realización, los complejos moleculares de la invención se utilizan en combinación con uno o más modificadores de respuesta biológica que son agonistas o antagonistas de diversos ligandos, receptores y moléculas de transducción de señales del sistema inmune. Por ejemplo, los modificadores de respuesta biológica incluyen, pero no se limitan a agonistas de receptores de tipo Toll (TLR-2, TLR-7, TLR-8 y TLR-9; LPS; agonistas de 41BB, OX40, ICOS y CD40, y antagonistas de ligando Fas, PD1, y CTLA-4. Estos agonistas y antagonistas pueden ser anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, péptidos, compuestos peptidomiméticos y polisacáridos.

0218 En otra realización, se usan complejos moleculares de la invención en combinación con uno o más modificadores de respuesta biológica que son ácidos nucleicos inmunoestimulantes. Tales ácidos nucleicos, muchos de los cuales son oligonucleótidos que comprenden un motivo Cpg no metilado, son mitogénicos para linfocitos vertebrados, y son conocidos por potenciar la respuesta inmune. Ver Woolridge et al., 1997, Blood 89:2994-2998. Tales oligonucleótidos se describen en las publicaciones de patente internacional N° WO 01/22972, WO 01/51083, WO 98/40100 y WO 99/61056, así como las patentes U.S. 6,207,646, 6,194,388, 6,218,371, 6,239,116, 6,429,199, y 6,406,705. Otros tipos de oligonucleótidos inmunoestimulantes, tales como oligodesoxinucleótidos que contienen fosforotioato motivos Ypg y CpR han sido descritos por Kandimalla et al., en Química Bioorgánica y Medicinal 9:807-813 (2001). También se abarcan oligonucleótidos inmunoestimulantes que carecen de dinucleótidos Cpg que cuando se administran por vías mucosas (incluyendo administración en dosis baja) o en dosis altas a través de las vías parenterales, aumentan las respuestas de anticuerpos, a menudo tanto como lo hicieron los ácidos nucleicos Cpg, sin embargo la respuesta fue sesgada por Th2 (IgG1>>IgG2a). Ver Patente U.S. N° de Publicación 20010044416 A1. Pueden realizarse métodos para determinar la actividad de oligonucleótidos inmunoestimulantes como se describe en las patentes y publicaciones antes mencionadas. Además, los oligonucleótidos inmunoestimulantes pueden ser modificados dentro del esqueleto de fosfato, azúcar, nucleobase y vínculos internucleotídicos con el fin de modular la actividad. Tales modificaciones son conocidas por los expertos en la materia.

0219 En otra realización, los complejos moleculares de la invención se utilizan en combinación con uno o más adyuvantes. En una realización específica, complejos moleculares de la invención se utiliza en combinación con una saponina (por ejemplo, QS-21) y/o un oligonucleótido inmunoestimulante (por ejemplo, un oligonucleótido que comprende al menos un dinucleótido Cpg). El adyuvante(s) se puede administrar por separado o presente en una composición en mezcla con complejos de la invención. Un adyuvante sistémico es un adyuvante que se puede suministrar por vía parenteral. Adyuvantes sistémicos incluyen adyuvantes que crean un efecto depósito, coadyuvantes que estimulan el sistema inmunológico y adyuvantes que hacen las dos cosas. Un adyuvante que crea un efecto depósito como se usa aquí, es un adyuvante que causa que el antígeno se libere lentamente en el cuerpo, prolongando así la exposición de las células inmunes al antígeno. Esta clase de adyuvantes incluyen pero no se limitan a alumbre (por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio); o formulaciones a base de emulsión que incluyen aceite mineral, aceite no mineral, emulsión de aceite agua-en-aceite o aceite-en-agua, emulsiones aceite-en-agua tales como series Seppic ISA de adyuvantes Montanide (por ejemplo, Montanide ISA 720, AirLiquide, París, Francia); MF-59 (una emulsión de escualeno en agua estabilizado con Span 85 y Tween 80; Chiron Corporation, Emeryville, Calif.; y PROVAX (una emulsión de aceite en agua que contiene un detergente estabilizante y un agente formador de micelas; IDEC Pharmaceuticals Corporation, San Diego, Calif.).

0220 Otros adyuvantes estimulan el sistema inmunitario, por ejemplo, provocan que una célula inmune produzca y secrete citocinas o IgG. Esta clase de adyuvantes incluye pero no se limita a ácidos nucleicos inmunoestimulantes, tales como oligonucleótidos Cpg; saponinas purificadas a partir de la corteza del árbol Q. saponaria, tales como QS21; poli[di(carboxylatophen-oxi) fosfaceno (polímero PCPP; Virus Research Institute, EE.UU.), derivados de lipopolisacáridos (LPS) tales como monofosforil lípido A (MPL; Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, Montana). muramil Bipéptido (MDP; Ribi) y treonil-muramil Bipéptido (t-MDP; Ribi); OM-174 (un disacárido de glucosamina relacionado con el lípido A, OM Pharma SA, en Meyrin, Suiza); fosfatos aminoalquil glucosaminida (AGPS, Corixa Corporation), y factor de elongación de Leishmania (una proteína de Leishmania purificada; Corixa Corporation, Seattle, Washington).

0221 Otros adyuvantes sistémicos son adyuvantes que crean un efecto depósito y estimulan el sistema inmunológico. Estos compuestos son aquellos compuestos que tienen ambas de las funciones de adyuvantes sistémicos anteriormente identificadas. Esta clase de adyuvantes incluye pero no se limita a ISCOMs (complejos inmunoestimulantes que contienen saponinas mixtas, lípidos y forma partículas de tamaño de virus con poros que pueden contener antígeno; CSL, Melbourne, Australia); SB-AS2 (sistema adyuvante # 2 SmithKline Beecham, que es una emulsión de aceite en agua que contiene MPL y QS21; SmithKline Beecham Biologicals [SBB], Rixensart, Bélgica); SB-AS4 (sistema adyuvante # 4 SmithKline Beecham, que contiene alumbre y MPL; SBB, Bélgica); copolímeros de bloques no iónicos que forman micelas tales como CRL 1005

(estos contienen una cadena lineal de polioxipropileno hidrofóbico flanqueado por cadenas de polioxietileno; Vaxcel, Inc., Norcross, Georgia) y Formulaci3n Adyuvante Syntex (SAF, una emulsi3n de aceite en agua que contiene Tween 80 y un copol3mero en bloque no i3nico; Qu3micos Syntex, Inc., Boulder, Colorado).

0222 Los adyuvantes mucosales 3tiles seg3n la invenci3n son adyuvantes que son capaces de inducir una
 5 respuesta inmune de la mucosa en un sujeto cuando se administra a una superficie de la mucosa en conjunci3n
 con los complejos de la invenci3n. Adyuvantes mucosales incluyen pero no est3n limitados a 3cidos nucleicos
 Cpg (por ejemplo, la solicitud de patente PCT publicada WO 99/61056), toxinas bacterianas: por ejemplo,
 10 toxina del c3lera (CT), derivados de CT, incluyendo pero no limitado a sub-unidad B de CT (CTB) (Wu et al.,
 1998, Tochikubo et al., 1998.); CTD53 (Val a Asp) (Fontana et al., 1995); CTK97 (Val a Lys) (Fontana et al.,
 1995); CTK104 (Tyr a Lys) (Fontana et al., 1995); CTD53/K63 (Val a Asp, Ser a Lys) (Fontana et al., 1995);
 15 CTH54 (Arg a His) (Fontana et al., 1995); CTN107 (His a Asn) (Fontana et al., 1995); CTE114 (Ser a Glu)
 (Fontana et al., 1995); CTE112K (Glu a Lys) (Yamamoto et al., 1997a); CTS61F (Ser a Phe) (Yamamoto et al.,
 1997a, 1997b); CTS106 (Pro a Lys) (Douce et al., 1997, Fontana et al., 1995), Y CTK63 (Ser a Lys) (Douce et
 al., 1997, Fontana et al., 1995), la toxina zonula occludens, zot, enterotoxina Escherichia coli l3bil al calor,
 20 toxina l3bil (LT), derivados de LT, incluyendo pero no limitado a subunidad B de LT (LTB) (Verweij et al., 1998);
 LT7K (Arg a Lys) (Komase et al., 1998, Douce et al., 1995); LT61F (Ser a Phe) (Komase et al., 1998); LT112K
 (Glu a Lys) (Komase et al., 1998); LT118E (Gly a Glu) (Komase et al., 1998); LT146E (Arg a Glu) (Komase et
 al., 1998); LT192G (Arg a Gly) (Komase et al., 1998); LTK63 (Ser a Lys) (Marchetti et al., 1998, Douce et al.,
 1997, 1998, Di Tommaso et al., 1996), y LTR72 (Ala a Arg) (Giuliani et al., 1998), toxina Pertussis, PT. (Lycke et
 25 al., 1992, Spangler BD, 1992, Freytag y Clemments, 1999, Roberts et al., 1995, Wilson et al., 1995) incluyendo
 PT-9K/129G (Roberts et al., 1995, Cropley et al., 1995), derivados de la toxina (ver m3s abajo) (Holmgren et al.,
 1993, Verweij et al., 1998, Rappuoli et al., 1995, Freytag y Clements, 1999); derivados de l3pidos A (por
 ejemplo, monofosforil l3pido A, MPL) (Sasaki et al., 1998, Vancott et al., 1998); derivados de Muramil Bipeptido
 (MDP) (Fukushima et al., 1996, Ogawa et al., 1989, Michalek et al., 1983, Morisaki et al., 1983); prote3nas
 30 bacterianas de membrana externa (por ejemplo, lipoprote3na de prote3na A de superficie exterior (OspA) de
 Borrelia burgdorferi, prote3na de membrana externa de Neisseria meningitidis) (Marinero et al., 1999, Van de
 Verg et al., 1996); emulsiones aceite-en-agua (por ejemplo, MF59) (Barchfield et al., 1999, Verschoor et al.,
 1999, O'Hagan, 1998); sales de aluminio (Isaka et al., 1998, 1999); y Saponinas (por ejemplo, QS21)
 Biopharmaceuticals Aquila, Inc., Worster, Me.) (Sasaki et al., 1998, MacNeal et al., 1998), ISCOMs, MF-59 (una
 35 emulsi3n de escualeno en agua estabilizada con Span 85 y Tween 80; Chiron Corporation, Emeryville, Calif.); la
 serie Seppic ISA de adyuvantes Montanide (por ejemplo, Montanide ISA 720; AirLiquide, Par3s, Francia);
 PROVAX (una emulsi3n de aceite en agua que contiene un detergente estabilizante y un agente formador de
 micelas; IDEC Pharmaceuticals Corporation, San Diego, California); Formulaci3n Coadyuvante Syntex (SAF;
 Syntex Chemicals, Inc., Boulder, Colorado), poli[di(carboxilatofenoxi) fosfaceno (pol3mero PCPP; Virus
 Research Institute, EE.UU.) y el factor de elongaci3n Leishmania (Corixa Corporation, Seattle, Washington).

5.8.1 C3NCERES DIANA

0223 La administraci3n de las composiciones de la invenci3n, solas o con las APCs sensibilizadas, estimula la
 inmunocompetencia del sujeto hu3sped y provoca inmunidad espec3fica contra las c3lulas preneopl3sicas y/o
 40 neopl3sicas. Como aqu3 se usa, c3lula "preneopl3sica" se refiere a una c3lula que est3 en transici3n de una
 forma normal a una neopl3sica. Evidencia morfol3gica, cada vez m3s respaldada por estudios de biolog3a
 molecular, indica que la preneoplasia progresa a trav3s de varios pasos. El crecimiento de c3lulas no-
 neopl3sicas a menudo consiste en hiperplasia, metaplasia, o m3s particularmente, displasia (para revisi3n de
 45 estas condiciones anormales de crecimiento, ver Robbins y Angell, 1976, Patolog3a de Base, 2da Ed., W.B.
 Saunders Co., Filadelfia, pp. 68 -79). La hiperplasia es una forma de proliferaci3n celular controlada que implica
 un aumento del n3mero de c3lulas en un tejido u 3rgano, sin alteraci3n significativa en la estructura o funci3n.
 Por ejemplo, la hiperplasia endometrial a menudo precede al c3ncer endometrial. La metaplasia es una forma
 de crecimiento celular controlado en la cual un tipo de c3lula adulta o totalmente diferenciada sustituye a otro
 tipo de c3lula adulta. La metaplasia puede ocurrir en c3lulas del tejido conectivo o epitelial. La metaplasia
 50 at3pica consiste en un epitelio metapl3sico un tanto desordenado. La displasia es a menudo un precursor de
 c3ncer, y se encuentra principalmente en el epitelio; es la forma m3s desordenada de crecimiento celular no

neoplásico, que implica una pérdida en la uniformidad de células individuales y en la orientación arquitectónica de las células. Células displásicas a menudo tienen núcleos muy manchados anormalmente grandes, y exhiben pleomorfismo. La displasia característicamente ocurre cuando existe irritación o inflamación crónica, y se encuentra a menudo en el cuello uterino, las vías respiratorias, cavidad oral, y la vesícula biliar. Aunque las lesiones preneoplásicas pueden progresar a neoplasia, también pueden permanecer estables durante largos períodos de tiempo y pueden incluso regresar, en particular si el agente de incitación es eliminado o si la lesión sucumbe a un ataque inmunológico por su huésped. Los cánceres que pueden ser tratados con las composiciones de la presente invención también incluyen, pero no se limitan a, sarcomas y carcinomas humanos. Sarcomas y carcinomas humanos también responden a la inmunoterapia adoptiva por la glicoproteína oligomerizada de complejos APCs sensibilizados.

0224 En una realización, la terapia de combinación abarca, en adición a la administración de los complejos moleculares de la invención, los usos complementarios de una o más modalidades que ayudan en la prevención o tratamiento del cáncer, cuyas modalidades incluyen, pero no se limitan a agentes quimioterapéuticos, inmunoterapia, agentes anti-angiogénicos, citocinas, hormonas, anticuerpos, polinucleótidos, agentes terapéuticos de radiación y fotodinámica. En realizaciones específicas, la terapia de combinación puede utilizarse para prevenir la recurrencia del cáncer, inhibir metástasis, o inhibir el crecimiento y/o la propagación del cáncer o metástasis.

0225 Tipos de cánceres que se pueden tratar o prevenir mediante los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a los sarcomas y carcinomas humanos, por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de la glándula sudorípara, carcinoma de la glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, cáncer de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda y leucemia mieloide aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemia crónica (leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica), y la policitemia vera, linfoma (la enfermedad de Hodgkin y la enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, y la enfermedad de cadena pesada.

0226 En otra realización, el paciente que tiene un cáncer es inmunosuprimido por razón de haberse sometido a terapia contra el cáncer (por ejemplo, radiación y quimioterapia) antes de la administración de los complejos moleculares de la invención o la administración de la APC lectina-Hsp sensibilizada.

0227 Hay muchas razones por las que se desea inmunoterapia proporcionada por la presente invención para uso en pacientes con cáncer. En primer lugar, la cirugía con anestesia puede dar lugar a inmunosupresión. Con inmunoterapia adecuada en el período preoperatorio, esta inmunosupresión puede prevenirse o invertirse. Esto podría conducir a un menor número de complicaciones infecciosas y a acelerada cicatrización de heridas. En segundo lugar, el volumen del tumor es mínimo después de la cirugía y la inmunoterapia es más probable que sea eficaz en esta situación. Una tercera razón es la posibilidad de que las células tumorales se desprendan en la circulación en cirugía y inmunoterapia efectiva aplicada en ese momento puede eliminar estas células.

0228 Los métodos preventivos y terapéuticos descritos en este documento están dirigidos a mejorar la inmunocompetencia del paciente con cáncer antes de la cirugía, durante o después de la cirugía, y para inducir inmunidad específica de tumor a las células cancerosas, siendo el objetivo la inhibición del cáncer, y siendo el último objetivo clínico la regresión total y la erradicación del cáncer. Los métodos de la invención también

pueden utilizarse en individuos con riesgo mayor de un tipo particular de cáncer, por ejemplo, debido a la historia familiar o factores ambientales de riesgo.

0229 En algunas realizaciones, uno o más agentes anti-cancerosos, además de los complejos moleculares de la invención, se administran a un sujeto necesitado del mismo para tratar o prevenir un cáncer. Un agente anti-cáncer se refiere a cualquier molécula o compuesto que ayuda en el tratamiento de tumores o cáncer. Ejemplos de agentes anti-cáncer que pueden ser utilizados en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: acivicin; aclarubicin; acodazole clorhidrato; acronine; adozelesin; aldesleukina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramycin; asparaginasa; asperlin; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; bisantreno clorhidrato; bisnafide dimesilato; bizelesin; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemide; carbetímero; carboplatino; carmustina; carubicin clorhidrato; carzelesin; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; crisnatol mesilato; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; daunorubicina clorhidrato; decitabina; dexormaplatin; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquone; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato droloxifeno; dromostanolone propionato; duazomicina; edatrexate; eflornitina clorhidrato; elsamitucin; enloplatin; enpromate; epipropidine; epirubicina hidrocloreto; erbulozole; clorhidrato de esorubicin; estramustina; fosfato de sodio estramustina; etanidazole; etopósido; fosfato de etopósido; etoprine; clorhidrato de fadrozol; fazarabine; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabine; fosquidone; fostriecin de sodio; gemcitabina; hidrocloreto de gemcitabina; hidroxiurea; clorhidrato de idarubicina; ifosfamida; ilmofosine; interleuquina II (incluyendo el uso de interleuquina II, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferon alfa-n3; interferón beta-1 a; interferón gamma-1 b; iproplatin; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreótida; letrozol; acetato de leuprolide; clorhidrato de liarozol; lometrexol de sodio; lomustina; clorhidrato de losoxantrone; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato de sodio; metoprine; meturedpa; mitindomide; mitocarcin; mitocromin; mitogillin; mitomalcin; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona, ácido micofenólico; nocodazole; nogalamina; ormaplatin; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomycin; pentamustine; peplomycin sulfato; perfosfamida; pipobroman; piposulfan; clorhidrato de piroxantrone; plicamicina; plomestane; porfímero de sodio; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puromicina; clorhidrato de puromicina; pyrazofurin; riboprine; rogletimide; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazene; sparfosate de sodio; sparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; spiromustine; spiroplatin; streptonigrin; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan de sodio; tegafur; clorhidrato de teloxantrone; temoporfin; tenipósido; teroxirone; testolactona; thiamiprine; tioguanina; tiotepa; tiazofurin; tirapazamina; toremifeno citrato; acetato de trestolone; fosfato de triciribine; trimetrexato; trimetrexato glucuronato; triptorelina; clorhidrato de tubulozole; mostaza de uracilo; uredepa; vaporetina; verteporfina; sulfato de vinblastina; vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidine; sulfato de vinylicinate; sulfato de vinleurosine; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidine; sulfato de vinzolidine; vorozol; zeniplatin; zinostatin; clorhidrato de zorubicin.

0230 Otros fármacos contra el cáncer que pueden ser usados incluyen, pero no se limitan a: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etniluracilo; abiraterona; aclarubicin; acylfulvene; adecypenol; adozelesin; aldesleukina; antagonistas ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox, amifostina, ácido aminolevulínico; amrubicin; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrographolide; inhibidores de la angiogénesis, antagonista D, antagonista G; antarelix, proteína morfogenética-1 anti-dorsalizante; antiandrógeno, carcinoma de próstata; antiestrógeno; antineoplaston; oligonucleótidos antisentido; glicinato aphidicolin; genes moduladores de la apoptosis, reguladores de la apoptosis, ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; deaminasa arginina; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatin 1; axinastatin 2; axinastatin 3; azasetron; azatoxina; azatyrosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas del BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilstaurosporina; derivados betalactámicos; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilsperrina; bisnafide; bistratene A; bizelesin; breffate; bropirimina; budotitane; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; canaripox de IL-2; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxamidotriazole; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartilago; carzelesin; inhibidores de la caseína quinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; chlorlins; cloroquinoxalina sulfonamida;

cicaprost; cis-porfirina; cladribina, análogos de clomifeno, clotrimazol; collismicina A, collismicina B; combretastatina A4; combretastatina analógica; conagenin; crambescidin 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacin A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; citarabina ocfosfate; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemnina B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; 5 dexrazoxano; dexverapamil; diaziquone; didemnina B; didox; dietilnorspermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; Bifenilo spiromustine; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxiluridine; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustine; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemene; emitefur; epirubicina; epristeride; estramustina analógica; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabine; fenretinida, filgrastim; finasteride; 10 flavopiridol; flezelastine; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecin; fotemustina; texapirina gadolinio; nitrato de galio; galocitabine; ganirelix; inhibidores de la gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; heregulina; bisacetamida hexametileno; hipericina; ácido ibandrónico; idarubicina; idoxifeno; idramantone; ilmofofina; ilomastat; imidazoacridones; imiquimod, péptidos inmunoestimulantes; inhibidor receptor del factor de crecimiento-1 tipo insulina; agonistas de interferón; 15 interferones; interleucinas; iobenguano; iododoxorubicin; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladine; isobengazol; isohomohalicondrin B; itasetron; jasplakinolide; Kahalalido F; lamellarin-N triacetato; lanreótida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinan; leptolstatin; letrozol; factor inhibidor de la leucemia, interferón alfa leucocitario; leuprolide+estrógeno+progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; poliamina lineal analógica; péptido disacárido lipofílico; compuestos lipofílicos de platino; lissoclinamida 7; lobaplatin; lombricine; lometrexol; 20 lonidamina; losoxantrone; lovastatina; loxoribine; lurtotecan; lutecio texapirina; lisofillina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspin; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasas de matriz; menogaril; merbarone; meterelin; methioninase; metoclopramida; inhibidor MIF, mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN de doble cadena no coincidentes; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafide; factor saporina de crecimiento de fibroblasto de mitotoxina; mitoxantrona; 25 mofarotene; molgramostim; anticuerpo monoclonal; gonadotrofina coriónica humana; monofosforil lípido A+micoobacteriana de la pared celular SK; mopidamol; inhibidores de gen de resistencia a múltiples fármacos; supresor de tumores múltiples basado en terapia-1; agente mostaza anti-cáncer; micaperoxido B; extracto de pared celular micobacteriana; miriaporona, N-acetilidinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavin; nafterpin; nartograstim; nedaplatin; nemorubicin; ácido neridrónico; 30 endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante nítrógeno; nitrullina; 06-bencilguanina; octreótida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracin; inductor oral de citoquinas; ormaplatin; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamine; palmitoilrhizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifene; parabactin; pentosano polisulfato de sodio; pazelliptine; pegaspargasa; peldesina pentostatina; pentrozol; perflubron; 35 perfosfamida; alcohol perílico; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de la fosfatasa; picibanil; clorhidrato de pilocarpina; pirarubicin; piritrexim; placetin A; placetin B, inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; prednisona; propilo bis acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; proteína A con sede en inmunomodulador; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de la proteína quinasa C; microalgas; inhibidores de la proteína 40 tirosina fosfatasa; inhibidores nucleósidos de la purina fosforilasa; purpurins; pyrazoloacridine; polioxietileno hemoglobina pyridoxylated conjugado; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetron; inhibidores ras farnesil de la proteína transferasa; inhibidores del SRA; inhibidor de la RAS-GAP; retelliptine desmetilado; renio Re etidronato 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohitukina; romurtide; roquinimex; rubiginone B1; ruboxil; safingol; saintopin; sarCNU; sarcotitol A; sargramostim; miméticos Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de senescencia; oligonucleótidos sentido; inhibidores de transducción de señales; moduladores de transducción de 45 señales; proteína ligante de antígeno de cadena simple; sizofiran; sobuzoxane; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína vinculante de somatomedina; sonermin; ácido sparfósico; spicamicina D; spiromustina; splenopentin; spongistatina 1; escualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de división de células madre; stipiamida; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista superactivo del péptido intestinal vasoactivo; suradista; suramina; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; tallimustina; metioduro tamoxifeno; taumustina; tazaroteno; tecogalan de sodio; tegafur; tellurapirilio; inhibidores de la telomerasa; 50 temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina;

- 5 trombopoyetina; trombopoyetina mimética; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinan; hormona estimulante del tiroides; etiopurpurin etilo de estaño; tirapazamina; titanoceno bicloruro; topsentin; toremifeno; factor de células madre totipotentes; inhibidores de la traslación; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosteride; inhibidores de la tirosina quinasa; tirfostinas; inhibidores de la UBC; ubenimex; factor inhibidor de crecimiento urogenital derivado de seno; antagonistas del receptor de uroquinasa; vaporeotida; variolin B; sistema de vectores; terapia génica de eritrocitos; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltine; vitaxin; vorozol; zanoterone; zeniplatin; zilascorb y zinostatina stimalamero.
- 10 0231 Un agente anticanceroso puede ser un agente quimioterapéutico que incluye pero no está limitado a, los siguientes grupos de compuestos: antibióticos citotóxicos, antimetabolitos, agentes anti-mitóticos, agentes alquilantes, compuestos de platino, compuestos de arsénico, inhibidores de la topoisomerasa de ADN, taxanos, nucleósidos análogos, alcaloides de plantas, y toxinas, y derivados sintéticos de los mismos. La tabla 2 enumera ejemplos de compuestos de los grupos:

TABLA 2

<u>Agentes alquilantes</u>	
Mostazas nitrogenadas:	Ciclofosfamida
	Ifosfamida
	Trofosfamida
	Clorambucil
Nitrosoureas:	Carmustina (BCNU)
	Lomustina (CCNU)
Alquilsulfonatos:	Busulfán
	Treosulfan
Triacenos:	Dacarbazina
Compuestos que contienen platino:	Cisplatino
	Carboplatino
	Aroplatin
	Oxaliplatino
<u>Alcaloides de plantas</u>	
Alcaloides de la vinca:	Vincristina
	Vinblastina
	Vindesina
	Vinorelbina
Taxoides:	Paclitaxel

	Docetaxol
Inhibidores de la Topoisomerasa de ADN	
Epipodophyllins:	Etopósido
	Tenipósido
	Topotecán
	9-aminocamptotecina
	Camptotecina
	Crisnatol
Mitomycin:	Mitomycin C
<u>Anti-folatos:</u>	
Inhibidores DHFR:	Metotrexato
	Trimetrexato
Inhibidores IMP deshidrogenasa:	Ácido micofenólico
	Tiazofurin
	Ribavirina
	EICAR
Inhibidores Ribonucleotide reductase:	Hidroxiurea
	Deferoxamina
<u>Análogos de la pirimidina:</u>	
Análogos de Uracilo:	5-Fluorouracil
	Floxuridina
	Doxifluridine
	Ratitrexed
Análogos de citosina:	Citarabina (ara C)
	Cytosine arabinoside
	Fludarabine
<u>Análogos de purina:</u>	Mercaptopurine

	Tioguanina
<u>Antimetabolitos de ADN:</u>	3-HP
	2'-desoxi-5-fluorouridina
	5-HP
	alfa-TGDR
	aphidicolin glicinato
	ara-C
	5-aza-2'-desoxicitidina
	beta-TGDR cyclocytidine guanazole
	inosina glycodialdehyde macebecin II
	pyrazoloimidazole
<u>Agentes antimitóticos:</u>	allocalchicine
	Halichondrin B
	colchicina
	derivado de colchicina
	dolstatin 10
	maitansina
	rizoxina
	tiocolchicina
	cisteína tritilo
<u>Otros:</u>	
Inhibidores de isoprenilación:	
Neurotoxinas dopaminérgicas:	1-metil-4-phenylpyridinium iones
Inhibidores del ciclo celular:	Estaurosporina
Actinomicinas:	Actinomicina D
	Dactinomicina
Bleomicinas:	Bleomicina A2
	Bleomicina B2
	Peplomycin

Antraciclinas:	Daunorrubicina
	Doxorrubicina (adriamicina)
	Idarubicina
	Epirubicina
	Pirarubicin
	Zorubicin
	Mitoxantrona
Inhibidores de MDR:	Verapamilo
Inhibidores Ca^{2+} de ATPasa:	Thapsigargin

- 5 0232 Composiciones que comprenden uno o más agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, FLAG, CHOP) también se contemplan en la presente invención. FLAG comprende fludarabina, arabinósido de citosina (Ara-C) y G-CSF. CHOP comprende ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y prednisona. Cada una de las listas anteriores es ilustrativa, y no se pretende que sean limitativas.
- 0233 En una realización, el cáncer de mama puede ser tratado con una composición farmacéutica que comprende complejos de la invención en combinación con, 5-fluorouracilo, cisplatino, docetaxel, doxorubicina, Herceptin®, gemcitabina, IL-2, paclitaxel, y/o VP-16 (etopósido).
- 10 0234 En otra realización, el cáncer de próstata puede ser tratado con una composición farmacéutica que comprende complejos de la invención en combinación con paclitaxel, docetaxel, mitoxantrona, y/o un antagonista receptor de andrógenos (por ejemplo, flutamida).
- 15 0235 En otra realización, la leucemia puede ser tratada con una composición farmacéutica que comprende complejos de la invención en combinación con fludarabina, citosina arabinósido, ozogamicina (Mylotarg), metotrexato daunorrubicina, vincristina, 6-mercaptopurina, idarubicina, mitoxantrona, etopósido, asparaginasa, prednisona y/o ciclofosfamida. Como otro ejemplo, el mieloma puede ser tratado con una composición farmacéutica que comprende complejos de la invención en combinación con dexametasona.
- 20 0236 En otra realización, el melanoma puede ser tratado con una composición farmacéutica que comprende complejos de la invención en combinación con dacarbazina.
- 0237 En otra realización, el cáncer colorrectal puede ser tratado con una composición farmacéutica que comprende complejos de la invención en combinación con irinotecan.
- 0238 En otra realización, el cáncer de pulmón puede ser tratado con una composición farmacéutica que comprende complejos de la invención en combinación con paclitaxel, docetaxel, etopósido y/o cisplatino.
- 25 0239 En otra realización, el linfoma no-Hodgkin puede ser tratado con una composición farmacéutica que comprende complejos de la invención en combinación con ciclofosfamida, CHOP, etopósido, bleomicina, mitoxantrona y/o cisplatino.
- 0240 En otra realización, el cáncer gástrico puede ser tratado con una composición farmacéutica que comprende complejos de la invención en combinación con cisplatino.
- 0241 En otra realización, el cáncer de páncreas puede ser tratado con una composición farmacéutica que comprende complejos de la invención en combinación con gemcitabina.

0242 De acuerdo con la invención, los complejos de la invención se pueden administrar antes, posteriormente, o simultáneamente con agente(s) anti-cáncer, para la prevención o tratamiento del cáncer. Dependiendo del tipo de cáncer, la historia del sujeto y condición, y el agente(s) anti-cáncer de elección, el uso de los complejos de la invención puede ser coordinado con la dosis y el momento de la quimioterapia.

5 0243 El uso de los complejos de la invención puede ser añadido a un régimen de quimioterapia. En una realización, el agente quimioterapéutico es gemcitabina a una dosis que varía desde 100 hasta 1000 mg/m²/ciclo. En una realización, el agente quimioterapéutico es dacarbazina a una dosis que varía desde 200 hasta 4000 mg/m²/ciclo. En una realización preferida, la dosis de dacarbazina oscila de 700 a 1000 mg/m²/ciclo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es fludarabina en dosis que van desde 25 hasta 50 mg/ m²/ciclo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es citosina arabinósido (Ara-C) a una dosis que varía desde 200 hasta 2000 mg/ m²/ciclo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es docetaxel a una dosis de 1,5 a 7,5 mg/kg/ciclo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es paclitaxel a una dosis que va desde 5 a 15 mg/kg/ciclo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es cisplatino en una dosis que va desde 5 a 20 mg/kg/ciclo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es 5-fluorouracilo en una dosis que va desde 5 a 20 mg/kg/ciclo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es doxorubicina a una dosis que va desde 2 a 8 mg/kg/ciclo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es epipodofilotoxina a una dosis que va desde 40 a 160 mg/kg/ciclo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es ciclofosfamida a una dosis que va desde 50 a 200 mg/kg/ciclo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es irinotecán a una dosis que va de 50 a 75, 75 a 100, 100 a 125, o 125 a 150 mg/ m²/ciclo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es vinblastina a una dosis que varía desde 3.7 hasta 5.4, 5.5 a 7.4, 7.5 a 11, o 11 a 18.5 mg/m²/ciclo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es vincristina a una dosis de 0.7 a 1.4, o 1.5 a 2 mg/ m²/ciclo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es metotrexato a una dosis que varía desde 3.3 a 5, 5 a 10, 10 a 100, o 100 a 1000 mg/ m²/ciclo.

25 0244 En una realización preferida, la invención abarca el uso de bajas dosis de agentes quimioterapéuticos cuando se administran como parte del régimen de terapia de combinación. Por ejemplo, el tratamiento inicial con los complejos de la invención aumenta la sensibilidad de un tumor a la estimulación subsiguiente con una dosis de agente quimioterapéutico, cuya dosis está cerca o por debajo del rango inferior de dosis cuando el agente quimioterapéutico se administra sin complejos de la invención.

30 0245 En una realización, los complejos de la invención y una dosis baja (por ejemplo, 6 a 60 mg/ m²/día o menos) de docetaxel se administran a un paciente con cáncer. En otra realización, los complejos de la invención y una dosis baja (por ejemplo, 10 a 135 mg/ m²/día o menos) de paclitaxel se administran a un paciente con cáncer. En otra realización, los complejos de la invención y una dosis baja (por ejemplo, 2.5 a 25 mg/ m²/día o menos) de fludarabina se administran a un paciente con cáncer. En otra realización, los complejos de la invención y una dosis baja (por ejemplo, 0.5 a 1.5 g/ m²/día o menos) de citosina arabinósido (Ara-C) se administran a un paciente con cáncer.

35 0246 En otra realización, el agente quimioterapéutico es gemcitabina a una dosis que va desde 10 a 100mg/ m²/ciclo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es cisplatino, PLATINOL por ejemplo, o PLATINOL AQ-(Bristol Myers), a una dosis que va desde 5 a 10, 10 a 20, 20 a 40, o 40 a 75 mg/ m²/ciclo. En otra realización, una dosis de cisplatino que va desde 7.5 hasta 75 mg/ m²/ciclo se administra a un paciente con cáncer de ovario. En otra realización, una dosis de cisplatino que va de 5 a 50 mg/ m²/ciclo se administra a un paciente con cáncer de vejiga. En otra realización, el agente quimioterapéutico es carboplatino, por ejemplo, PARAPLATIN (Bristol Myers), a una dosis de 2 a 4, 4 a 8, 8 a 16, 16 a 35, o 35 a 75 mg/ m²/ciclo. En otra realización, una dosis de carboplatino que va de 7.5 a 75 mg/m²/ciclo se administra a un paciente con cáncer de ovario. En otra realización, una dosis de carboplatino que va de 5 a 50 mg/ m²/ciclo se administra a un paciente con cáncer de vejiga. En otra realización, una dosis de carboplatino que va de 2 a 20 mg/ m²/ciclo se administra a un paciente con cáncer de testículo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es docetaxel, por ejemplo, TAXOTERE (Rhône Poulenc Rorer) a una dosis que va de 6 a 10, 10 a 30, o mg/ m²/ciclo 30 a 60. En otra realización, el agente quimioterapéutico es paclitaxel, taxol, por ejemplo, (Bristol Myers Squibb), a una dosis de 10 a 20, 20 a 40, 40 a 70, ó 70 a 135 mg/kg/ciclo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es

5-fluorouracilo en una dosis que varía de 0.5 a 5 mg/kg/ciclo. En otra realización, el agente quimioterapéutico es doxorubicina, por ejemplo, ADRIAMICINA (Pharmacia & Upjohn), DOXIL (Alza), RUBEX (Bristol Myers Squibb), a una dosis de 2 a 4, 4 a 8, 8 a 15, 15 a 30, o 30 a 60 mg/kg/ciclo.

0247 En otra realización, los complejos de la invención se administran en combinación con uno o más agentes inmunoterapéuticos, tales como anticuerpos y vacunas. En una realización preferida, los anticuerpos tienen usos terapéuticos y/o profilácticos in vivo contra el cáncer. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden usarse para el tratamiento y/o prevención de enfermedades infecciosas. Ejemplos de anticuerpos terapéuticos y profilácticos incluyen, pero no se limitan a, MDX-010 (Medarex, NJ), que es un anticuerpo anti-CTLA-4 humanizado actualmente en clínica para el tratamiento del cáncer de próstata; SYNAGIS® (MedImmune, MD), el cual es un virus sincitial anti-respiratorio humanizado (RSV) anticuerpo monoclonal para el tratamiento de pacientes con infección por RSV; HERCEPTIN® (Trastuzumab) (Genentech, CA), que es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico. Otros ejemplos son un anti-CD18 F (ab')₂ humanizado (Genentech); CDP860 que es un anti-CD18 F (ab')₂ humanizado (Celltech, Reino Unido); PRO542 que es un anticuerpo anti-gp120 del VIH fusionado con CD4 (Transgénicos Progenics/Genzyme); Ostavir que es un virus anticuerpo anti hepatitis B humano (Laboratorio de Diseño de Proteínas/Novartis), PROTOVIR™ que es un anticuerpo anti-CMV de IgG1 humanizado (Laboratorio de Diseño de Proteínas/Novartis), MAK-195 (SEGARD) el cual es un murino anti-TNF-α (ab')₂ (Knoll Pharma / BASF), IC 14, el cual es un anticuerpo anti-CD 14 (ICOS Pharm); un anticuerpo anti-VEGF IgG1 humanizado (Genentech); OVAREX™ el cual es un anticuerpo murino anti-CA 125 (AltaRex); PANOREX™ el cual es un anticuerpo IgG2a antígeno de superficie celular murino anti-17-IA (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un murino anti-idiotipo (GD3 epítipo) anticuerpo IgG (Sistema ImClone); IMCC225 que es un anticuerpo anti-EGFR IgG quimérico (Sistema ImClone); VITAXIN™ que es un anticuerpo integrino anti-αVβ3 humanizado (Evolución Molecular Aplicada/MedImmune); Campath 1H/LDP-03 que es un anticuerpo anti CD52 IgG1 humanizado (LeukoSite); Smart M195 que es un anticuerpo anti-CD33 IgG humanizado (Laboratorio de Diseño de Proteínas/Kanebo); RITUXAN™ que es un anticuerpo anti-CD20 IgG1 quimérico (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); LYMPHOCIDE™ que es un anticuerpo anti-CD22 IgG humanizado (Immunomedics); Smart ID 10, que es un anticuerpo anti-HLA humanizado (proteínas Laboratorio de Diseño); ONCOLYM™ (Lym-1) es un anticuerpo reactivo de diagnóstico anti-HLA radiomarcado murino (Techniclone); ABX-IL8 es un anticuerpo anti-IL8 humano (Abgenix); anti-CD11a es un anticuerpo IgG1 humanizado (Genentech/Xoma); ICM3 es un anticuerpo anti-ICAM3 humanizado (ICOS Pharm), IDEC-114 es un anticuerpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharm/Mitsubishi); ZEVALIN™ es un anticuerpo anti-CD20 radiomarcado murino (IDEC/Schering AG); IDEC-131 es un anticuerpo anti-CD40L humanizado (IDEC / Eisai), el IDEC-151 es un anticuerpo anti-CD4 primatizado (IDEC), IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es un anticuerpo anti-CD3 IgG humanizado (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo factor 5 anti-complemento humanizado (C5) (Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo anti-TNF-α humanizado (CAT/BASF); CDP870 es un fragmento Fab anti-TNF-α humanizado (Celltech), IDEC-151 es un anticuerpo anti-CD4 IgG1 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham), MDX-CD4 es un ser anticuerpo anti-CD4 IgG humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo anti-TNF-αIgG4 humanizado (Celltech), LDP-02 es un anticuerpo anti-α4β7 humanizado (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo anti-CD4 IgG humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo anti-CD40L IgG humanizado (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo anti-VLA-4 IgG humanizado (Elan); MDX-33 es un anticuerpo anti-CD64 (FcαR) humano (Medarex/Centocor); SCH55700 es un anticuerpo anti-IL-5 IgG4 humanizado (Celltech/Schering), SB-240563 y SB240683 son anticuerpos anti-IL-5 e IL-4 humanizados, respectivamente, (SmithKline Beecham); rhuMab-E25 es un anticuerpo anti-IgE IgG1 humanizado (Genentech/Norvartis/Tanox Biosystems), ABX-CBL es un anticuerpo anti CD-147 IgM murino (Abgenix); BTI-322 es un anticuerpo anti-CD2 IgG de rata (Trasplante MedimmuneBio); Orthoclone/OKT3 es un anticuerpo anti-CD3 IgG2a murino (Ortho Biotech); SIMULECT™ es un anticuerpo anti-CD25 IgG1 quimérico (Novartis Pharm); LDP-01 es un anticuerpo anti-β2-integrina IgG humanizado (LeukoSite); Anti-LFA-1 es un CD18 F(ab')₂ murino (Pasteur-Merieux/humunotech); CAT-152 es un anticuerpo anti-TGF-β2 humano (Cambridge ab Tech), y Corsevin M es un anticuerpo anti-factor VII quimérico (Centocor). Los reactivos inmunorreactivos mencionados anteriormente, así como cualesquiera otros reactivos inmunorreactivos, se pueden administrar de acuerdo con cualquier régimen conocido por los expertos en la materia, incluyendo los regímenes recomendados por los proveedores de reactivos inmunorreactivos. En una

realización preferida, los complejos moleculares de la invención se administran en combinación con el anticuerpo anti-CTLA4, o un anticuerpo anti-41BB.

0248 En otra realización, los complejos de la invención se administran en combinación con uno o más agentes antiangiogénicos, que incluyen, pero no se limitan a, angiostatina, talidomida, kringle 5, endostatina, serpina (inhibidor de la serina proteasa) anti-trombina, fragmentos proteolíticos 29 kDa N-terminal y un 40 kDa C-terminal de fibronectina, fragmento proteolítico 16 kDa de prolactina, fragmento proteolítico 7,8 kDa de factor plaquetario-4, un péptido de 13 aminoácidos correspondiente a un fragmento de factor plaquetario-4 (Maione et al., 1990, Cancer Res. 51:2077-2083), un péptido de 14 aminoácidos que corresponde a un fragmento de colágeno I (Tolma et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511), un péptido de 19 aminoácidos correspondiente a un fragmento de trombospondina I (Tolsma et al., 1993, J. Cell Biol. 122:497-511), un péptido 20-aminoácido correspondiente a un fragmento de SPARC (Sage et al., 1995, J. Cell. Biochem. 57:1329-1334), o cualquier fragmento, miembro de la familia, o sus variantes, incluyendo las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

0249 Otros péptidos que inhiben la angiogénesis y corresponden a fragmentos de laminina, fibronectina, procolágeno, y EGF también han sido descritos (ver, por ejemplo, Cao, 1998, Prog Mol Subcell Biol. 20:161-176). Los anticuerpos monoclonales y pentapéptidos cíclicos, que bloquean ciertas integrinas que se unen proteínas RGD (es decir, poseen el motivo péptido Arg-Gly-Asp), han demostrado tener actividad de anti-vascularización (Brooks et al., 1994, Science 264:569-571; Hammes et al., 1996, Medicina Natural 2:529-533). Por otra parte, la inhibición del receptor activador del plasminógeno urocinasa por antagonistas del receptor inhibe el crecimiento de la angiogénesis, y metástasis tumoral (Min et al., 1996, Cancer Res. 56: 2428-33; Crowley et al., 1993, Proc Natl Acad Sci 90:5021-25). El uso de tales agentes anti-angiogénicos en combinación con los complejos también se contempla por la presente invención.

0250 En otra realización, se utilizan complejos de la invención en asociación con un tratamiento hormonal. Los tratamientos terapéuticos hormonales comprenden agonistas hormonales, antagonistas hormonales (por ejemplo, flutamida, bicalutamida, tamoxifeno, raloxifeno, acetato de leuprolida (LUPRON), antagonistas de LH-RH), inhibidores de la biosíntesis y procesamiento, y esteroides de las hormonas (por ejemplo, dexametasona, retinoides, deltoides, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona, dehidrotestosterona, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógeno, testosterona, progesterona), derivados de la vitamina A (por ejemplo, el ácido trans-retinoico (ATRA)); análogos de la vitamina D3; antigestagens (por ejemplo, mifepristona, onapristona), y antiandrógenos (por ejemplo, acetato de ciproterona).

0251 En otra realización, se utilizan complejos de la invención en asociación con un programa de terapia génica en el tratamiento del cáncer. En una realización, la terapia génica con células recombinantes que secretan interleuquina-2 se administra en combinación con complejos de la invención para prevenir o tratar el cáncer, particularmente el cáncer de mama (Ver, por ejemplo, Deshmukh et al., 2001, J Neurosurg. 94:287-92). En otras realizaciones, la terapia génica se realiza con el uso de compuestos de polinucleótidos, tales como pero no se limitan a polinucleótidos antisentido, ribozimas, moléculas de ARN de interferencia, polinucleótidos triple hélice y similares, donde la secuencia de nucleótidos de estos compuestos presentes se relaciona con las secuencias de nucleótidos de ADN y/o ARN de genes que están vinculados a la iniciación, progresión y/o patología de un tumor o cáncer. Por ejemplo, muchos son oncogenes, genes del factor de crecimiento, genes del receptor del factor de crecimiento, genes del ciclo celular, genes de reparación del ADN, y son bien conocidos en la materia.

0252 En otra realización, se administran complejos de la invención en combinación con un régimen de radioterapia. Para el tratamiento de radiación, la radiación puede ser rayos gamma o rayos-X. Los métodos abarcan el tratamiento del cáncer que comprende la radioterapia, como la radioterapia de haz externo, la implantación intersticial de radioisótopos (I-125, paladio, iridio), radioisótopos como el estroncio-89, la radioterapia torácica, la radioterapia intraperitoneal P-32, y/o la radioterapia total abdominal y pélvica. Para una visión general de la radioterapia, ver Hellman, Capítulo 16: Principios de la Gestión del Cáncer: Radioterapia, 6ta edición, 2001, DeVita et al., eds., J.B. Lippencott Company, Filadelfia. En realizaciones preferidas, el tratamiento de radiación se administra en forma de radiación de haz externo o teleterapia en donde la radiación se dirige desde una fuente remota. En diversas realizaciones preferidas, el tratamiento de radiación es

administrado como terapia interna o braquiterapia en donde una fuente radiactiva se coloca dentro del cuerpo cerca de las células cancerosas o a una masa tumoral. También se abarca el uso combinado de complejos de la invención con terapia fotodinámica que comprende la administración de fotosensibilizadores, tales como hematoporfirina y sus derivados, Vertoporfirina (BPD-MA), ftalocianina, fotosensibilizador Pc4 desmetoxihypocrellin A, y 2BA-2-DMHA.

0253 En diversas realizaciones, los complejos de la invención se administran en combinación con al menos un agente quimioterapéutico, por un ciclo de tratamiento corto a un paciente con cáncer para tratar el cáncer. La duración del tratamiento con el agente quimioterapéutico puede variar de acuerdo con el particular agente terapéutico del cáncer utilizado. La invención también contempla la administración discontinua o la dosis diaria dividida en varias administraciones parciales. Un tiempo de tratamiento apropiado para un agente terapéutico del cáncer en particular será apreciado por el experto en la materia, y la invención contempla la evaluación continua de programas de tratamiento óptimos para cada agente terapéutico del cáncer. La presente invención contempla por lo menos un ciclo, preferiblemente más de un ciclo durante el cual se administra una sola terapéutica o secuencia de terapéuticas. Un período de tiempo adecuado para un ciclo será apreciado por el experto en la materia, al igual que el número total de ciclos, y el intervalo entre ciclos.

0254 En otra realización, se utilizan complejos de la invención en combinación con compuestos que mejoran los síntomas del cáncer (tales como, pero no limitados al dolor) y los efectos secundarios producidos por los complejos de la invención (tales como, pero no limitados a síntomas como gripe, fiebre, etc.) En consecuencia, muchos compuestos conocidos para reducir dolor, síntomas de gripe, y fiebre se pueden utilizar en combinación o en mezcla con complejos de la invención. Tales compuestos incluyen analgésicos (por ejemplo, acetaminofeno), descongestionantes (por ejemplo, pseudoefedrina), antihistamínicos (por ejemplo, maleato de clorfeniramina), y supresores de la tos (por ejemplo, dextrometorfano).

5.8.2 ENFERMEDADES INFECCIOSAS DIANA

0255 Las enfermedades infecciosas que pueden ser tratadas o prevenidas por los métodos de la presente invención son causadas por agentes infecciosos, incluyendo pero no limitadoS a, virus, bacterias, hongos protozoos, helmintos y parásitos. La invención no se limita a tratar o prevenir enfermedades infecciosas causadas por patógenos intracelulares. Muchos microorganismos médicamente relevantes se han descrito ampliamente en la literatura, por ejemplo, véase CGA Thomas, Microbiología Médica, Bailliere Tindall, Gran Bretaña 1983.

0256 La terapia de combinación abarca en adición A la administración de complejos de la invención, los usos de una o más modalidades que ayudaN en la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas, CUYAS modalidades incluyen, pero no se limitan a antibióticos, antivíricOs, compuestos antiprotozoarios, compuestos antifúngicos y antihelmínticos. Otras modalidades de tratamiento que pueden ser utilizados para tratar o prevenir enfermedades infecciosas incluyen inmunoterapia, polinucleótidos, anticuerpos, citoquinas y hormonas como se ha descrito anteriormente.

0257 El virus infeccioso de vertebrados humanos y no humanos, incluye retrovirus, virus de ARN y virus de ADN. Ejemplos de virus que han sido encontrados en humanos incluyen pero no están limitados a: Retroviridae (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1 (también conocido como HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III; y otros aislados, como VIH-LP; Picomaviridae (por ejemplo, virus de poliomielitis, hepatitis A, enterovirus, virus Cocksackie humano, rinovirus, echovirus); Calciviridae (por ejemplo, cepas que causan gastroenteritis); Togaviridae (por ejemplo, virus de encefalitis equina, virus rubéola); Flaviridae (por ejemplo, virus del dengue, virus de encefalitis, virus de fiebre amarilla); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (por ejemplo, Ébola virus); Paramyxoviridae (por ejemplo, virus parainfluenza, virus de paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de influenza); Bungaviridae (por ejemplo, virus Hantaan, virus Bunga, phlebovirus y virus Nairo); Arena viridae (virus de fiebre hemorrágica), Reoviridae (por ejemplo, orbiviruses reovirus y rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (hepatitis virus B); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (virus del papiloma, virus del polioma); Adenoviridae (la mayoría de los adenovirus);

Herpesviridae (virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, virus de varicela zoster, citomegalovirus (VMC), virus del herpes; Poxviridae (virus de viruela, virus vaccinia, virus de viruela) y Iridoviridae (por ejemplo, virus de fiebre porcina africana), y virus no clasificados (por ejemplo, agentes etiológicos de encefalopatías espongiiformes, el agente de hepatitis delta (se cree que es un satélite defectuoso del virus de hepatitis B), agentes de la hepatitis no-A, no-B (clase 1=transmitido internamente, clase 2=transmitida por vía parenteral (es decir, hepatitis C), Norwalk y virus relacionados, y astrovirus).

0258 Retrovirus que se contemplan incluyen tanto retrovirus simples como retrovirus complejos. Los retrovirus simples incluyen los subgrupos de retrovirus de tipo B, retrovirus de tipo C y retrovirus de tipo D. Un ejemplo de un retrovirus de tipo B es el virus de tumor mamario de ratón (MMTV). Los retrovirus de tipo C incluyen subgrupos del grupo A de tipo C (incluyendo el virus del sarcoma de Rous (RSV), virus de leucemia aviar (ALV), y virus de mieloblastosis aviar (AMV)) y el grupo B de tipo C (incluido el virus de leucemia murina (MLV), virus de leucemia felina (FeLV), virus del sarcoma murino (MSV), virus de leucemia de mono gibón (GALV), virus de necrosis del bazo (SNV), virus de reticuloendoteliosis (RV) y virus de sarcoma de simio (SSV)). Los retrovirus de tipo D incluyen el virus de mono Mason-Pfizer (MPMV) y el retrovirus de simio de tipo 1 (SRV-1). Los retrovirus complejos incluyen los subgrupos de lentivirus, virus de células T de la leucemia y virus espumosos. Los lentivirus incluyen VIH-1, pero también incluyen VIH-2, SIV, virus Visna, virus de inmunodeficiencia felina (FIV), y virus de anemia infecciosa equina (AIE). Los virus de leucemia de células T incluyen el HTLV-1, HTLV-II, virus de leucemia de células T de simio (STLV), y virus de leucemia bovina (VLB). Los virus espumosos incluyen virus espumoso humano (VAF), virus espumoso de simio (SFV) y virus espumoso bovino (BFV).

0259 Ejemplos de virus de ARN que son antígenos en animales vertebrados incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: miembros de la familia Reoviridae, incluyendo el género Orthoreovirus (múltiples serotipos tanto de retrovirus de mamíferos y aves), el género Orbivirus (virus de la lengua azul, virus Eugenangee, virus Kemerovo, virus de la peste equina y virus de la fiebre de garrapata de Colorado), el género Rotavirus (rotavirus humano, virus de la diarrea de becerro de Nebraska, rotavirus murino, rotavirus de simio, rotavirus bovino u ovino, rotavirus aviar); la familia Picomaviridae, incluyendo el género Enterovirus (poliovirus, virus Cocksackie A y B, virus huérfano entérico citopático humano (ECHO), virus de hepatitis A, enterovirus de simio, virus encefalomiелitis murina (ME), muris poliovirus, enterovirus bovino, enterovirus porcino, el género Cardiovirus (virus encefalomiocarditis (EMC), virus Mengo), el género Rinovirus (rinovirus humano, incluyendo al menos 113 subtipos; otros rinovirus), el género Aphovirus (fiebre aftosa (VFA), la familia Calciviridae, incluyendo exantema vesicular de virus porcino, virus de lobos marinos de San Miguel, picornavirus felina y el virus de Norwalk; la familia Togaviridae, incluyendo el género Alphavirus (virus de la encefalitis equina del este, virus Semliki Forest, virus Sindbis, virus Chikungunya, virus O'Nyong-Nyong, virus del río Ross, el virus de la encefalitis equina Venezolana, virus de la encefalitis equina occidental), el género Flavivirus (virus transmitido por mosquitos de la fiebre amarilla, virus del Dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis del Valle Murray, virus del Nilo Occidental, virus Kunjin, virus transmitido por la garrapata de Europa central, virus transmitido por la garrapata del Lejano Oriente, virus del bosque Kyasanur, virus Louping III, virus Powassan, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk), el género Rubivirus (virus de la Rubéola), el género Pestivirus (virus de la enfermedad de las mucosas, virus del cólera porcino, virus de la enfermedad de la frontera), la familia Bunyaviridae, incluyendo el género Bunyavirus (Bunyamwera y virus relacionados, virus del grupo encefalitis de California), el género Phlebovirus (virus Sandfly de la fiebre de Sicilia, virus de la fiebre del Valle del Rift), el género Nairovirus (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus de la enfermedad ovina de Nairobi), y el género Uukuvirus (Uukuniemi y los virus relacionados); la familia Orthomyxoviridae, incluyendo el virus del género influenza (virus de la influenza tipo A, muchos subtipos humanos); Virus de la gripe porcina, y el virus de la gripe aviar y equina, influenza tipo B (muchos subtipos humanos), y la influenza de tipo C (posible género separado), la familia Paramyxoviridae, incluyendo el género Paramyxovirus (virus parainfluenza de tipo 1, virus Sendai, virus Hemadsorción, virus parainfluenza de tipo 2 a 5, virus de la Enfermedad de Newcastle, virus de las paperas), el género Morbillivirus (virus del sarampión, virus panencefalitis esclerosante subaguda, virus del moquillo, virus de la peste bovina), el género Pneumovirus (virus respiratorio sincitial (VRS), virus sincitial respiratorio bovino y el virus de la neumonía de ratones); virus de la selva, virus Sindbis, virus Chikungunya, virus O'Nyong-Nyong, virus del río Ross, virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina occidental), el género Flavivirus (transmitida por mosquitos del virus de

la fiebre amarilla, virus del Dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de San Louis, virus de la encefalitis del Valle Murray, virus del Nilo Occidental, virus Kunjin, virus transmitido por la garrapata de europa central, virus de la transmitido por la garrapata del Lejano Oriente, virus del bosque Kyasanur, virus Louping III, virus Powassan, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk), el género Rubivirus (virus de la Rubéola), el género Pestivirus (virus de la enfermedad de las mucosas, virus del cólera porcino, virus de la enfermedad de la frontera); la familia Bunyaviridae, incluyendo el género Bunyavirus (Bunyamwera y virus relacionados, virus del grupo encefalitis de California), el género Phlebovirus (virus de la fiebre por flebótomos siciliana, virus de la fiebre del Valle del Rift), el género Nairovirus (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus de la enfermedad ovina de Nairobi), y el género Uukuvirus (Uukuniemi y virus relacionados), la familia Orthomyxoviridae, incluyendo el virus del género influenza (virus influenza tipo A, muchos subtipos humanos), virus de la gripe porcina, y el virus de la gripe aviar y equina, influenza tipo B (muchos subtipos humanos) y la influenza de tipo C (posible género separado); la familia Paramyxoviridae, incluyendo el género Paramyxovirus (virus de la parainfluenza de tipo 1, el virus Sendai, virus Hemadsorción, virus de la parainfluenza de tipo 2 a 5, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la parotiditis), el género Morbillivirus (virus del sarampión, virus panencefalitis esclerosante subaguda, virus del moquillo, virus de la peste bovina), el género Pneumovirus (virus respiratorio sincitial (VRS), virus respiratorio sincitial bovino y el virus de la neumonía de los ratones); la familia Rhabdoviridae, incluyendo el género Vesiculovirus (VSV), virus ChanBipura, virus Flandes-Hart Park), el género Lyssavirus (virus de la rabia), rbdovirus de peces, y dos rbdovirus probables (el virus de Marburg y el virus del Ébola), la familia Arenaviridae, incluyendo virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM), complejo vírica Tacaribe, y virus de Lassa; la familia Coronaviridae, incluido el virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), el virus de la hepatitis del ratón, coronavirus entérico humano, y peritonitis infecciosa Felina (coronavirus felino).

0260 Virus de ADN ilustrativos que son antígenos en animales vertebrados incluyen, pero no están limitados a: la familia Poxviridae, incluyendo el género Orthopoxvirus (Variola mayor, Variola menor, viruela de mono vaccinia, viruela vacuna, buffalopox, Rabbitpox, Ectromelia), el género Leporipoxvirus (Mixoma, fibroma), el género Avipoxvirus (viruela aviar, virus de la viruela aviar de otro tipo), el género capripoxvirus (viruela ovina, viruela caprina), el género Suipoxvirus (viruela porcina), el género parapoxvirus (virus de la dermatitis postular contagioso, pseudoviruela bovina, virus de la estomatitis papular bovina); la familia Iridoviridae (virus de la peste porcina africana, los virus de la rana 2 y 3, el virus de Linfocistis de pescado), la familia Herpesviridae, incluyendo los alfa-herpesvirus (herpes simplex tipos 1 y 2, varicela-zoster, el virus del aborto equino, el virus del herpes equino 2 y 3, virus de la pseudorrabia, virus queratoconjuntivitis bovino infecciosa, virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa, virus de la rinotraqueitis felina, virus de la laringotraqueitis infecciosa) los beta-herpesvirus (citomegalovirus humano y citomegalovirus de cerdos, monos y roedores); la gamma-herpesvirus (virus Epstein-Barr (VEB), virus de la enfermedad de Marek, Herpes saimiri, Herpesvirus ateles, Herpesvirus sylvilagus, el virus del herpes de conejillo de indias, el virus del tumor de Lucke), la familia Adenoviridae, incluyendo el género Mastadenovirus (subgrupos humanos A, B, C, D, E y no agrupados, adenovirus de simio (por lo menos 23 serotipos), la hepatitis infecciosa canina, y adenovirus de ganado vacuno, cerdos, ovejas, ranas y muchas otras especies, el género Aviadenovirus (adenovirus aviar); y los adenovirus no cultivables, la familia Papoviridae, incluyendo el género del virus del papiloma (virus del papiloma humano, virus del papiloma bovino, virus del papiloma de conejo Shope, y varios virus del papiloma patógenos de otras especies), el género Poliomavirus (poliomavirus, agente vacuolizante de sinio (SV-40), agente vacuolizante de conejo (RKV), virus K, virus BK, virus JC, y otros virus polioma primates tales como el virus del papiloma linfotrópico); la familia Parvoviridae incluyendo el género de virus Adeno-asociados, el género parvovirus (virus de la panleucopenia felina, parvovirus bovino, parvovirus canino, virus de la enfermedad de visón Aleutianas, etc.) Por último, los virus de ADN pueden contener virus que no se ajusten a las familias mencionadas, como los virus de la enfermedad de kuru y Creutzfeldt-Jacob y agentes neuropáticos crónicos infecciosos.

0261 Muchos ejemplos de compuestos antivíricos que pueden ser utilizados en combinación con los complejos de la invención son conocidos en la materia e incluyen pero no están limitados a: rifampicina, inhibidores de la transcriptasa nucleósido inversa (por ejemplo, AZT, ddI, ddC, 3TC, d4T), inhibidores de la transcriptasa no nucleósido inversa (por ejemplo, Efavirenz, Nevirapina), inhibidores de la proteasa (por ejemplo, aprenavir, indinavir, ritonavir y saquinavir), idoxuridina, cidofovir, aciclovir, ganciclovir, zanamivir, amantadina y palivizumab. Otros ejemplos de agentes anti-víricos incluyen, pero no se limitan a Acemannan; Aciclovir;

Aciclovir Sódico; Adefovir; Alovudina; Alvircept Sudotox; Clorhidrato de Amantadina; Aranotin; Arildona; Mesilato Ateviridine; Avridina; Cidofovir; Cipamfylline; Clorhidrato de Citarabina; Mesilato de Delavirdina; Desciclovir; Didanosina; Disoxaril; Edoxudine; Enviradene; Enviroxima, Famciclovir, Clorhidrato de Famotina; Fiacitabine; Fialuridine; Fosarilate; Foscarnet Sódico, Fosfonet Sódico; Ganciclovir; Ganciclovir Sódico; Idoxuridina; Kethoxal; Lamivudina; Lobucavir; Clorhidrato de Memotina; Metisazona; Nevirapina; Penciclovir; Pirodavid; Ribavirina, Clorhidrato de Rimantadina; Mesilato de Saquinavir; Clorhidrato de Somantadina; Sorivudina; Statolon; Estavudina; Clorhidrato de Tilorone; Trifluridina; Clorhidrato de Valaciclovir; Vidarabina; Fosfato de Vidarabina; Fosfato de Sodio de Vidarabina; Viroxime; Zalcitabina; Zidovudina; Zinviroxime.

0262 Las infecciones bacterianas o enfermedades que pueden ser tratadas o prevenidas por los métodos descritos en este documento son causadas por bacterias, incluyendo pero no limitadas a, bacterias que tienen una fase intracelular en su ciclo de vida, tales como micobacterias (por ejemplo, micobacteria tuberculosis, *M. bovis*, *M. avium*, *M. leprae* o *M. africanum*), rickettsia, micoplasma, clamidia y la legionella. Otros ejemplos de infecciones bacterianas contemplados incluyen pero no se limitan a las infecciones causadas por bacilo Gram positivo (por ejemplo, *Listeria*, Bacilo tales como Bacilo anthracis, especies *Erysipelothrix*), bacilo Gram negativo (por ejemplo, *Bartonella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Vibrio* y especies de *Yersinia*), bacteria espiroqueta (por ejemplo, especies de *Borrelia*, incluyendo *Borrelia burgdorferi* que causa la enfermedad de Lyme), bacterias anaeróbicas (por ejemplo, *Actinomyces* y especies *Clostridium*), Bacterias cocos Gram positivos y negativos, especies de *Enterococcus*, especies de *Streptococcus*, especies de neumococo, especies de estafilococo, las especies de *Neisseria*. Ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen pero no están limitados a: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Estreptococos del grupo A), *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B), *Streptococcus viridans*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Perfringens Clostridium*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, *israeli* *Actinomyces*.

0263 Agentes antibacterianos o antibióticos que se pueden utilizar en combinación con los complejos de la invención incluyen pero no están limitados a: antibióticos aminoglicósidos (por ejemplo, apramicina, arbekacin, bambarmycins, butirosin, dibekacina, neomicina, neomicina, undecilinato, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina, y la espectinomicina), antibióticos de amfenicol (por ejemplo, azidamfenicol, cloranfenicol, florfenicol y tianfenicol), antibióticos ansamicina (por ejemplo, rifamida y rifampicina), carbacephems (por ejemplo, loracarbef), carbapenémicos (por ejemplo, biapenem e imipenem), cefalosporinas (por ejemplo, cefaclor, cefadroxilo, cefamandol, cefatrizina, cefazedone, cefozopran, cefpimizole, cefpiramida y cefpiroma), cefamicinas (por ejemplo, cefbuperazone, cefmetazol y cefiniox), monobactámicos (por ejemplo, aztreonam, carumonam y tigemonam), oxacephems (por ejemplo, flomoxef, y moxalactam), penicilinas (por ejemplo, amdinocilina, amdinocillin pivoxilo, amoxicilina, bacampicilina, ácido benzylpenicillinic, bencilpenicilina sódica, epicilina, fenbenicilina, floxacilina, penamccilina, hidroyoduro penetamato, penicilina o-benetamina, penicilina O, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina, penimepiciclina y potasio fencihicilina), lincosamidas (por ejemplo, clindamicina y lincomicina), macrólidos (por ejemplo, azitromicina, carbomicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina y acistrate eritromicina), anfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, enduracidin, enviomicina, tetraciclina (por ejemplo, apicycline, clortetraciclina, clomocyclina y la demeclociclina), 2,4-diaminopirimidinas (por ejemplo, brodimoprim), nitrofuranos (por ejemplo, furaltadona, y cloruro de furazolum), quinolonas y análogos de los mismos (por ejemplo, cinoxacina, ciprofloxacina, clinafloxacina, flumequina y grepagloxacin), sulfonamidas (por ejemplo, sulfamethoxypyrazine acetilo, benzilsulfamida, noprilsulfamida, ftalilsulfacetamida, sulfacrisoidina y sulfacitina), sulfonas (por ejemplo, diatimosulfona, sodio glucosulfona y solasulfona), cicloserina, mupirocina y tuberina.

0264 Ejemplos adicionales de agentes antibacterianos incluyen pero no están limitados a Acedapsone; Sodio Acetosulfone; Alamecin; Alexidina; Amdinocillin; Amdinocillin Pivoxilo; Amicycline; Amifloxacin; Mesilato Amifloxacin; Amikacina; Sulfato de Amikacina; Ácido Aminosalicílico; Sodio Aminosalicilato; Amoxicilina; Anfomicina; Ampicilina; Ampicilina de Sodio; Sodio Apalcillin; Apramicina; Aspartocin; Sulfato Astromicin; 5 Avilamicina; Avoparcina; Azitromicina; Azlocilina; Azlocilina de sodio; Clorhidrato de Bacampicillin; Bacitracina; Disalicilato Metileno de Bacitracina; Bacitracina de Zinc; Bambermycins; Calcio Benzoylpas; Berythromicina; Sulfato Betamicin; Biapenem; Biniramicina; Clorhidrato de Biphenamine; Bispyrithione Magsulfex; Butikacin; Sulfato Butirosin; Sulfato de Capreomicina; Carbadox, Carbenicilina Disodio; Carbenicilina Sódica Indanilo; Carbenicilina Sódica Fenilo; Carbenicilina Potasio; Carumonam de Sodio; Cefaclor, Cefadroxilo, Cefamandol; 10 Nafate Cefamandol, Cefamandol de Sodio; Cefaparolet; Cefatrizine; Cefazaflur de Sodio; Cefazolina; Cefazolina Sódica; Cefbuperazone; Cefdinir; Cefepima; Clorhidrato de Cefepima; Cefetecol; Cefixima; Clorhidrato de Cefmenoxime; Cefinetazole; Cefmetazol de sodio; Cefonicida Monosódico; Cefonicida de Sodio; Cefoperazona de Sodio; Ceforanide; Cefotaxima Sódica, Cefotetán; Cefotetán Disódico; Clorhidrato de Cefotiam; Cefoxitina; Cefoxitina Sódica; Cefpimizole; Cefpimizole de Sodio; Cefpiramida; Cefpiramida de Sodio, Sulfato de 15 Cefpiroma; Cefpodoxima Proxetil; Cefprozil; Cefroxadine; Cefsulodina de Sodio; Ceftazidima; Cefibuten; Ceftizoxima de Sodio; Ceftriaxona Sódica, Cefuroxima; Cefuroxima Axetilo; Pivoxetil Cefuroxima; Cefuroxima Sódica; Cefacetil de Sodio; Cefalexina; Clorhidrato de Cefalexina; Cephaloglycin; Cefaloridina; Cefalotina Sódica; Cefapirina Sódica; Cefradina; Clorhidrato de Cetocycline; Cetofenicol; Cloranfenicol; Palmitato de Cloranfenicol; Complejo Cloranfenicol Pantotenato; Cloranfenicol Succinato de Sodio; Fosfanilato de 20 Clorhexidina; Cloroxilenol; Bisulfato Clortetraciclina, Clorhidrato de Clortetraciclina; Cinoxacina; Ciprofloxacina; Clorhidrato de Ciprofloxacina; Cirolemicina, Claritromicina, Clorhidrato de Clinafloxacina; Clindamicina; Clorhidrato de Clindamicina; Clorhidrato de Clindamicina Palmitato; Fosfato de Clindamicina; Clofazimina; Cloxacilina Benzatínica; Cloxacilina Sódica; Cloxyquin; Colistimetato de Sodio; Sulfato de Colistina; Coumermicina; Coumermycin de Sodio; Cyclacillin; Cicloserina; Dalfopristina; Dapsona; Daptomicina; 25 Demeclociclina; Clorhidrato de Demeclociclina; Demeciclina; Denofungin; Diaveridina; Dicloxacilina; Dicloxacilina Sódica; Sulfato de Dihidroestreptomina; Bipyrrithione; Diritromicina; Doxiciclina; Calcio Doxiciclina; Doxiciclina Fosfatex; Doxiciclina Hiclat; Droxacina de Sodio; Enoxacin; Epicillin; Clorhidrato de Eptetracycline; Eritromicina; Eritromicina Acistrate; Estolato de Eritromicina; Etilsuccinato de Eritromicina; Eritromicina Gluceptato; Eritromicina Lactobionato; Eritromicina Propionato; Estearato de Eritromicina; Clorhidrato de 30 Etambutol; Etionamida; Fleroxacina; Floxacillin; Fludalanine; Flumequina; Fosfomicina; Fosfomicina Trometamina; Fumoxicillin; Cloruro Furazolium; Tartrato Furazolium; Fusidato de Sodio; Ácido Fusídico; Sulfato de Gentamicina; Gloximonom; Gramicidina; Haloprogin; Hetacilina; Hetacilina Potasio; Hexedine; Ibafoxacina; Imipenem; Isoconazol; Isepamicina; Isoniazida; Josamicina; Sulfato de Kanamicina; Kitasamicina; Levofuraltadone; Potasio Levopropylcillin; Lexithromicina; Lincomicina; Clorhidrato de Lincomicina; 35 Lomefloxacin; Clorhidrato de Lomefloxacin; Mesilato de Lomefloxacin; Loracarbef; Mafenide; Meclociclina; Sulfosalicilato Meclociclina; Megalomicin Fosfato de Potasio; Mequidox; Meropenem; Metaciclina; Clorhidrato de Metaciclina; Metenamina; Metenamina Hipurato; Mandelato de Metenamina; Meticilina de Sodio; Metioprim; Clorhidrato de Metronidazol; Fosfato de Metronidazol; Mezlocilina, Mezlocilina de Sodio; Minociclina; Clorhidrato de Minociclina; Clorhidrato de Mirincamicina; Monensina; Monensina Sódica; Nafcilina Sódica; Nalidixate de 40 Sodio; Ácido Nalidíxico; Natamicina; Nebramicina; Neomicina Palmitato; Sulfato de Neomicina; Undecilenato Neomicina; Sulfato de Netilmicina; Neutramicina; Nifuradene; Nifuraldezone; Nifuratel; Nifuratrone; Nifurdazil; Nifurimide; Nifurpirinol; Nifurquinazol; Nifurthiazole; Nitrocycleline; Nitrofurantoína; Nitromide; Norfloxacin; Novobiocina de Sodio; Ofloxacin; Ormetoprim; Oxacilina Sódica; Oximonam; Oximonam de Sodio, Ácido Oxolínico, Oxitetraciclina; Oxitetraciclina Calcio; Clorhidrato de Oxitetraciclina; Paldimicina; Paraclorofenol; 45 Paulomicina; Pefloxacin; Mesilato Pefloxacin; Penamecillin; Penicilina G Benzatínica; Penicilina G Potásica; Penicilina G Procaína; Penicilina G Sódica; Penicilina V; Penicilina V Benzatínica; Penicilina V Hidrabamina; Penicilina V Potásica; Pentizidona de Sodio; Aminosalicilato Fenilo; Piperacilina Sódica; Pirbenicillin de Sodio; Piridicillin de Sodio; Clorhidrato de Pirlimicina; Clorhidrato de Pivampicilina; Pivampicilina Pamoato; Pivampicilina Probenate; Sulfato de Polimixina B; Porfiromicina; Propikacin; Pirazinamida; Piritona de Zinc; 50 Acetato de Quindecamine; Quinupristina; Racephenicol; Ramoplanin; Ranimicina; Relomicina; Repromicin; Rifabutina; Rifametane; Rifamexil; Rifamida; Rifampicina; Rifapentina; Rifaximina; Rolitetraciclina; Nitrato Rolitetraciclina; Rosaramicin; Rosaramicin Butirato; Rosaramicin Propionato; Rosaramicin Fosfato de Sodio;

Rosaramicin Estearato; Rosoxacin; Roxarsone; Roxitromicina; Sancycline; Sanfetrinem de Sodio; Sarmoxicillin; Sarpicillin; Scopafingín; Sisomicina; Sulfato de Sisomicina; Esparfloxacin; Clorhidrato de Espectinomicina; Espiramicina; Clorhidrato de Stallimicina; Steffimicina; Sulfato de Estreptomicina; Streptonicozid; Sulfabenz; Sulfabenzamida; Sulfacetamida; Sulfacetamida Sódica; Sulfacitina; Sulfadiazina; Sulfadiazina de Sodio; 5 Sulfadoxina; Sulfalene; Sulfamerazina; Sulfameter; Sulfametazina; Sulfametizol; Sulfametoxazol; Sulfamonomethoxine; Sulfamoxole; Sulfanilate de Zinc; Sulfanitrán; Sulfasalazina; Sulfasomizole; Sulfatiazol; Sulfazamet; Sulfisoxazol; Sulfisoxazol Acetil; Sulfisoxazol Diolamina; Sulfomyxin; Sulopenem; Sultamicilina; Suncillin de Sodio; Clorhidrato de Talampicilina; Teicoplanina; Clorhidrato de Temafloxacin; Temocillin; Tetraciclina; Clorhidrato de Tetraciclina; Complejo Fosfato de Tetraciclina; Tetroxoprima; Tianfenicol; 10 Thiphencillin potasio; Ticarcilina Cresilo de Sodio; Ticarcilina Disódica; Ticarcilina Monosódica; Ticlatone; Cloruro de Tiodonium; Tobramicina; Sulfato de Tobramicina; Tosufloxacin; Trimetoprim; Sulfato de Trimetoprim; Trisulfapyrimidines; Troleandomicina; Sulfato de Trospectomicina; Tirotricina; Vancomicina; Hidrocloruro de Vancomicina; Virgimamicina; Zorbamicina.

0265 Enfermedades causadas por hongos que pueden ser tratadas o prevenidas por los métodos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a aspergilliosis, cryptococcosis, esporotricosis, coccidioidomycosis, 15 paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, blastomycosis, cigomicosis, y candidiasis.

0266 Compuestos antifúngicos que se pueden utilizar en combinación con los complejos de la invención incluyen pero no están limitados a: polienos (por ejemplo, anfotericina B, candicidina, mepartricina, natamicina, y nistatina), alilaminas (por ejemplo, butenafina y naftifina), imidazoles (por ejemplo, bifonazol, butoconazol, 20 chlordanol, flutrimazol, isoconazol, ketoconazol y lanoconazole), tiocarbamatos (por ejemplo, tolclato, tolindate y tolinaftato), triazoles (por ejemplo, fluconazol, itraconazol, saperconazol, y terconazol), bromosalicylchloranilide, buclosamida, propionato de calcio, clorofenesina, ciclopirox, azaserina, griseofulvina, oligomycins, neomicina undecilenato, pyrrolnitrin, siccanin, tubercidin y viridin. Otros ejemplos de compuestos antifúngicos incluyen, pero no se limitan a Acrisorcin; Ambruticin; Anfotericina B; Azaconazol; Azaserina; 25 Basifungin; Bifonazol; Clorhidrato de Biphenamine; Bispirithione Magsulfex; Nitrato de Butoconazol; Undecilenato de Calcio; Candicidina; Carbol-fucsina; Chlordanol; Ciclopirox, Ciclopirox Olamina; Cilofungin; Cisconazole; Clotrimazol; Cuprimyxin; Denofungin; Bipyritlione; Doconazole; Econazol, Nitrato de Econazol; Enilconazol; Nitrato Ethonarn; Nitrato Fenticonazol; Filipina, Fluconazol, Flucitosina; Fungimicina; Griseofulvina; Hamicina; Isoconazol; Itraconazol; Kalafungin; Ketoconazol; Lomofungin; Lydimicina; Mepartricina; Miconazol; 30 Nitrato de Miconazol; Monensina; Monensina Sódica; Clorhidrato de Naftifme; Neomicina Undecilenato; Nifuratel; Nifurmerone; Clorhidrato de Nitalamine; Nistatina, Ácido Octanoico, Nitrato Orconazole; Nitrato de Oxiconazol; Clorhidrato de Oxifungin; Clorhidrato de Parconazol; Partricina, Yoduro de Potasio; Proclonol; Piritona de Zinc; Pyrrolnitrin; Rutamicina; Cloruro de Sanguinarium; Saperconazol; Scopafungin; Sulfuro de Selenio; Sinefungina; Nitrato Sulconazol; Terbinafina; Terconazole; Tiram; Ticlatone; Tioconazole; Tolclato; 35 Tolindate; Tolinaftato; Triacetina; Triafungin; Ácido Undecilénico; Viridofilvina; Undecilenato de Zinc; y Clorhidrato de Zinoconazol.

0267 Las enfermedades parasitarias que pueden ser tratadas o prevenidas por los métodos descritos aquí incluyen, pero no se limitan a, amebiasis, malaria, leishmania, coccidios, giardiasis, criptosporidiosis, toxoplasmosis, y la tripanosomiasis. También abarcadas están las infecciones por varios gusanos, tales como 40 pero no limitados a la ascariasis, anquilostomiasis, tricuriasis, estrogiloidiasis, toxocariasis, triquinosis, oncocercosis, filariasis, y la dirofilariosis. También se abarcan infecciones por varios trematodos, tales como pero no limitados a esquistosomiasis, paragonimiasis, y clonorquiasis. Los parásitos que causan estas enfermedades se pueden clasificar en función de si son intracelulares o extracelulares. Un "parásito intracelular" como aquí se usa es un parásito que en todo su ciclo de vida es intracelular. Ejemplos de parásitos 45 intracelulares humanos incluyen Leishmania spp., Plasmodium spp., Trypanosoma cruzi, Toxoplasma gondii, Babesia spp., y Trichinella spiralis. Un "parásito extracelular" como aquí se usa es un parásito que en todo su ciclo de vida es extracelular. Parásitos extracelulares capaces de infectar a los seres humanos incluyen Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, Enterocytozoon bienuesi, Naegleria y Acanthamoeba, así como la mayoría de los helmintos. Sin embargo, otra clase de parásitos se define como siendo principalmente 50 extracelular, pero con una existencia intracelular obligada, en una etapa crítica de su ciclo de vida. Tales

parásitos se denominan en este documento como "parásitos intracelulares obligados". Estos parásitos pueden existir la mayor parte de su vida o sólo una pequeña parte de sus vidas en un entorno extracelular, pero todos tienen al menos una etapa intracelular obligada en sus ciclos de vida. Esta última categoría incluye los parásitos *Trypanosoma rhodesiense* y *Trypanosoma gambiense*, *Isospora* spp., *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp., *Neospora* spp., *Sarcocystis* spp., y *Schistosoma* spp.

0268 Muchos ejemplos de compuestos antiprotozoarios que pueden ser utilizados en combinación con los complejos de la invención para tratar enfermedades parasitarias son conocidos en la materia e incluyen pero no están limitados a: quininas, cloroquina, mefloquina, proguanil, pirimetamina, metronidazol, diloxanida de mometasona, tinidazol, anfotericina, estibogluconato sódico, cotrimoxazol y pentamidina. Muchos ejemplos de fármacos antiparasitarios que se pueden utilizar en combinación con los complejos de la invención para tratar enfermedades parasitarias son conocidos en la materia e incluyen pero no están limitados a: mebendazol, levamisol, niclosamida, praziquantel, albendazol, ivermectina, dietilcarbamazina, y tiabendazol. Otros ejemplos de compuestos antiparasitarios incluyen pero no están limitados a Acedapsone; Clorhidrato de Amodiaquina; Amquinate; Arteflene; Cloroquina; Clorhidrato de Cloroquina; Fosfato de Cloroquina; Cicloguanil Pamoato; Fosfato de Enpiroline; Clorhidrato de Halofantrina; Sulfato de Hidroxicloroquina; Clorhidrato de Mefloquina; Menoctona; Clorhidrato de Mirincamicina; Fosfato de Primaquina, Pirimetamina, Sulfato de Quinina, y Tebuquina.

0269 En una realización menos preferida, los complejos de la invención se pueden utilizar en combinación con una composición de vacuna no-HSP y basada en no- α 2M. Ejemplos de estas vacunas para seres humanos se describen en el Jordan Report 2000, Desarrollo Acelerado de las Vacunas, Instituto Nacional de Salud. Muchas vacunas para el tratamiento de vertebrados no humanos, se describen en Bennett, K. Compendio de Productos Veterinarios, 3ra ed. Compendios de América del Norte, Inc., 1995, que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

5.8.3 Orientación a Otras Enfermedades

0270 Además del cáncer y enfermedades infecciosas, otras enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, la anemia, deficiencias de hormona de crecimiento, enfermedades de deficiencia de enzimas, y las condiciones de supresión inmune, también pueden tratarse o prevenirse por los métodos de la presente invención.

0271 La anemia puede ser causada por varias razones, por ejemplo, puede ser causada por deficiencia de hierro, ácido fólico, enfermedades crónicas (por ejemplo, infección, o inflamación crónica, cáncer, enfermedades del hígado, insuficiencia renal crónica), quimioterapia, etc.

0272 La hormona del crecimiento es segregada por la glándula pituitaria anterior en humanos. La deficiencia de la hormona del crecimiento en la edad adulta tiende a provocar una leve o moderada obesidad, astenia y disminución del gasto cardíaco. La hormona de crecimiento humano puede ser sintetizada por técnicas de ADN recombinante. Los pacientes con hipopituitarismo y deficiencia severa de hormona de crecimiento pueden ser tratados con hormona de crecimiento humano.

0273 Hay muchos tipos diferentes de enfermedades de deficiencia de enzimas. Ejemplos no limitativos son la deficiencia de enzima Debrancher (también conocido como Cori o enfermedad de Forbes), las enfermedades por almacenamiento de glucógeno (por ejemplo, deficiencia de la enzima desramificante del glucógeno), deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), deficiencia de galactosylcereamidase (enfermedad de Krabbe), etc.

0274 Aunque sin limitación por ninguna teoría, una de las posibles explicaciones de los efectos terapéuticos o profilácticos de los complejos moleculares de la invención o las composiciones farmacéuticas que comprenden los complejos moleculares de la invención para tratar o prevenir enfermedades tales como la anemia, la deficiencia de hormona del crecimiento, y enfermedades de deficiencia de enzimas es que la oligomerización de una glicoproteína inmunológicamente y/o biológicamente activa, que tiene efecto terapéutico o profiláctico en estas enfermedades, puede mejorar el efecto terapéutico o profiláctico de la glicoproteína en comparación con

la glicoproteína no-oligomerizada. Por ejemplo, la glicoproteína oligomerizada puede ser más fácilmente dirigida a un sitio deseable o a un tipo de célula deseable, por ejemplo, mediante la unión de la lectina en el complejo a los receptores de glicoproteína de superficie celular. Por lo tanto, preferiblemente la lectina está en exceso molar en el complejo. Alternativamente, la glicoproteína oligomerizada puede ser más fácilmente absorbida por sus células diana ya sea por sucesos mediados por receptor o sucesos no mediados por receptor.

0275 Las hormonas y enzimas que son conocidas en la materia para el tratamiento o prevención de enfermedades, tales como, pero no limitadas a, anemia, deficiencias hormonales, o deficiencias enzimáticas, se pueden utilizar según la presente invención. Las hormonas y enzimas que son glicoproteínas que ocurren naturalmente (por ejemplo, la eritropoyetina) pueden formar oligómeros, en presencia de una lectina y se utilizan según la presente invención. Hormonas y enzimas que no son glicoproteínas que ocurren naturalmente pueden ser diseñadas para añadir uno o más grupos de hidratos de carbono y utilizadas de acuerdo con la presente invención. En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar la anemia, que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello una composición que comprende uno o más complejos moleculares, en donde cada complejo comprende una lectina y una eritropoyetina (EPO). Preferiblemente, el sujeto es un humano, y la EPO administrada es una EPO humana. La EPO es una hormona glicoproteínica producida principalmente por las células del endotelio capilar peritubular del riñón, y es responsable de la regulación de la producción de glóbulos rojos. En otra realización, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad de deficiencia enzimática que comprende administrar una composición que comprende una lectina y una glucocerebrosidasa. Preferiblemente, la enfermedad de deficiencia de la enzima a ser tratada es la enfermedad de Gaucher.

0276 Las condiciones de inmunosupresión pueden ser causada por varias razones, incluyendo pero no limitadas a, cáncer (por ejemplo, timoma, enfermedad de Hodgkin), Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), sarcoidosis y quimioterapia. Proteínas que son conocidas por estimular el sistema inmune pueden usarse de acuerdo con la presente invención para tratar o prevenir una condición de inmunosupresión. En una realización, la presente invención proporciona un método de tratamiento o prevención de una afección inmunosupresora que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello una composición que comprende uno o más complejos moleculares, en donde cada complejo comprende una lectina y un factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF). En otra realización, la presente invención proporciona un método de tratamiento o prevención de una condición de inmunosupresión que comprende administrar a un sujeto necesitado del mismo una composición que comprende uno o más complejos moleculares, en donde cada complejo comprende una lectina y un factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF).

5.8.4 Realización Autóloga

0277 La inmunogenicidad específica de las HSPs, no se deriva de las HSPs en sí, sino de las proteínas antigénicas vinculadas a ellas. En una realización preferida de la invención, los complejos en las composiciones de las invenciones para uso como vacunas contra el cáncer son complejos autólogos, eludiendo así dos de los obstáculos más difíciles para la inmunoterapia del cáncer. En primer lugar hay la posibilidad de que los cánceres humanos, como los cánceres de animales de experimentación, sean antigénicamente diferentes. Para eludir este obstáculo, en una realización preferida de la presente invención, las HSPs-lectina se complejan a proteínas antigénicas, y los complejos se utilizan para tratar los cánceres en el mismo sujeto del que las proteínas se derivan. En segundo lugar, los enfoques más actuales de la inmunoterapia del cáncer se centran en la determinación de los epítomos CTL reconocidos de líneas celulares de cáncer. Este enfoque requiere la disponibilidad de líneas celulares y CTLs contra el cáncer. Estos reactivos no están disponibles para una inmensa mayoría de los cánceres humanos. En una realización de la presente invención dirigida a la utilización de proteínas antigénicas autólogas, la inmunoterapia del cáncer no depende de la disponibilidad de líneas celulares o CTLs ni requiere definición de los epítomos antigénicos de las células cancerosas. Estas ventajas hacen a los complejos de lectina-HSPs enlazados a proteínas antigénicas autólogos inmunógenos atractivos contra el cáncer.

0278 En algunas realizaciones, las proteínas antigénicas en los complejos terapéuticos o profilácticos se pueden preparar a partir de tejido canceroso de un mismo tipo de cáncer de un sujeto alogénico al sujeto al que los complejos se administran.

5.9 Preparaciones Farmacéuticas y Métodos de Administración

- 5 0279 Los complejos moleculares y composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar a un paciente en dosis terapéuticamente eficaces para tratar o mejorar una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer, enfermedades infecciosas, anemia, condiciones inmunosupresivas, deficiencias enzimáticas o deficiencias hormonales). Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad de complejos suficiente para dar lugar a la mejoría de los síntomas de dicho trastorno. La dosis eficaz de complejos puede ser diferente cuando otra modalidad de tratamiento se utiliza en combinación. Las dosificaciones apropiadas y recomendadas, formulación y vías de administración para las modalidades de tratamiento tales como agentes quimioterapéuticos, radioterapia y agentes biológicos/inmunoterapéuticos tales como las citoquinas son conocidos en la técnica (por ejemplo, como se describe en la literatura como Physicians' Desk Reference (56va ed., 2002, 57va ed., 2003, y 58va ed., 2004)), o puede ser utilizado de acuerdo con las instrucciones o direcciones del fabricante.

5.9.1 Dosis Eficaz

- 20 0280 La toxicidad y eficacia terapéutica de los complejos moleculares de la invención puede determinarse por procedimientos farmacéuticos en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede ser expresada como la relación de LD₅₀ / ED₅₀. Se prefieren complejos que exhiben grandes índices terapéuticos. Mientras que pueden utilizarse complejos que exhiben efectos tóxicos secundarios, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de suministro que dirija a tales complejos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a células no infectadas y, por consiguiente, reducir los efectos secundarios.

- 25 0281 En una realización, los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar en la formulación de un intervalo de dosificación para uso en humanos. La dosificación de los complejos se encuentra preferentemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier complejo utilizado en el método descrito en este documento, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede ser formulada en modelos animales para conseguir un rango de concentración en plasma circulante que incluye la IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición máxima media de los síntomas) como se determina en el cultivo celular. Dicha información puede utilizarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en el plasma pueden ser medidos, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento.

- 40 0282 En otra realización, la cantidad de complejos moleculares de la invención que comprenden lectinas y complejos Hsp96-Molécula Antigénica que se administran a un sujeto está en el rango de aproximadamente 1 nanogramo a unos 600 microgramos para un paciente humano. La dosis humana preferida es la misma que la utilizada en un ratón 25g, es decir, en el rango de unos 1-10ng, unos 20ng, unos 30ng, unos 40ng, unos 50ng, unos 70ng, unos 100ng, unos 200ng, unos 300ng, unos 400ng, unos 500ng, unos 600ng, unos 700ng, unos 800ng, unos 900ng, unos 1µg, unos 10µg, unos 25µg, unos 50µg, unos 100µg, unos 200µg, unos 300µg, unos 400µg, unos 500µg, o unos de 600µg. La dosificación para los complejos moleculares de la invención que comprende lectina asociada con cualquier otro complejo HSP en un paciente humano está en el rango de unos 5 a 5.000 microgramos, la dosis preferida es de 100 microgramos. Estas dosis se administran preferiblemente por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. Estas dosis se puede administrar una o varias veces, por ejemplo todos los días, cada dos días, semanal, quincenal o mensual. Preferiblemente, los complejos se dan una vez por semana durante un período de alrededor de 4-6 semanas, y el modo o el sitio de administración es preferiblemente variado con cada administración. Así, a modo de ejemplo y no de

limitación, la primera inyección se puede administrar por vía subcutánea en el brazo izquierdo, la segunda en el brazo derecho, la tercera en el vientre izquierdo, la cuarta en el vientre derecho, la quinta en el muslo izquierdo, la sexta en el muslo derecho, etc. El mismo sitio puede ser repetido después de un intervalo de una o más inyecciones. Además, las inyecciones divididas pueden ser dadas. Así, por ejemplo, la mitad de la dosis se puede administrar en un sitio y la otra mitad en otro sitio el mismo día. Alternativamente, el modo de administración se varió de forma secuencial, por ejemplo, las inyecciones semanales se dan en secuencia por vía intradérmica, intramuscular, subcutánea, intravenosa o intraperitoneal. Preferiblemente, la dosis semanal se da por un período de 4 semanas. Después de 4-6 semanas, inyecciones adicionales se administran preferentemente a intervalos de dos semanas durante un período de tiempo de uno o más meses, o hasta que el suministro de los complejos se ha agotado. El ritmo de las inyecciones posteriores puede ser modificado, dependiendo de la evolución clínica del paciente y la respuesta a la inmunoterapia. En un ejemplo preferido, las administraciones intradérmicas se dan, con cada sitio de administración variado de forma secuencial.

0283 En consecuencia, la descripción describe métodos para prevenir y tratar cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar una composición que estimula la inmunocompetencia del individuo huésped y provoca inmunidad específica contra las células preneoplásicas y/o neoplásicas o células infectadas.

0284 En una realización específica, durante la terapia de combinación, los complejos moleculares de la invención (por ejemplo, complejos moleculares que comprenden una lectina y una HSP) se administran en una cantidad sub-óptima, por ejemplo, una cantidad que no manifiesta beneficios terapéuticos detectables cuando se administra en ausencia de modalidad terapéutica, según lo determinado por métodos conocidos en la materia. En tales métodos, la administración de tal cantidad sub-óptima de un complejo molecular de la invención a un sujeto que recibe una modalidad terapéutica resulta en una mejora general de la eficacia del tratamiento. En otra realización específica, una modalidad terapéutica que no comprende los complejos moleculares de la invención se administra en una cantidad sub-óptima durante la terapia de combinación. En tales métodos, la administración de tal cantidad sub-óptima de la modalidad terapéutica a un sujeto que recibe un complejo molecular de la invención resulta en una mejora general de la eficacia del tratamiento.

0285 En una realización, uno o más complejos moleculares de la invención se administran en una cantidad que no resulta en la regresión del tumor o la remisión del cáncer o una cantidad en la que las células cancerosas no se han reducido considerablemente o se han incrementado cuando dichos complejos moleculares se administran en ausencia de otra modalidad terapéutica. En otra realización, la cantidad sub-óptima de complejos moleculares de la invención se administra a un sujeto que recibe una modalidad de tratamiento mediante el cual la eficacia total del tratamiento mejora. Entre estos sujetos tratados con los complejos moleculares de la invención están los que reciben quimioterapia o radioterapia. Una cantidad sub-óptima puede determinarse por estudios con animales adecuados. Tal cantidad sub-óptima en humanos puede ser determinada por extrapolación a partir de experimentos en animales.

0286 En una realización, uno o más complejos moleculares de la invención comprende lectina asociada con una glicoproteína y una Molécula Antigénica, en el que la glicoproteína no es una proteína de choque térmico. Por ejemplo, el complejo molecular de la invención puede comprender eritropoyetina (EPO). Cuando la EPO se utiliza como un único fármaco, la dosis inicial comúnmente utilizada es de 25-30 unidades por inyección kg, dos o tres veces por semana. (En promedio 5000-6000 unidades por semana). Algunos pacientes pueden manejar cada semana o incluso cada dos semanas con inyecciones subcutáneas. La EPO intravenosa debe ser dada un mínimo de 2 o 3 veces por semana. Otros regímenes de dosificación se pueden encontrar en Physician's Desk References (56va ed., 2002, 57va ed., 2003, y 58va ed., 2004).

0287 En otra realización, el complejo molecular de la invención puede comprender un activador del plasminógeno tisular (tPA), tales como Alteplasa (Activase®, Genentech). La Alteplasa es un glucoproteína purificada de 527 aminoácidos. La Alteplasa se utiliza en el manejo y el tratamiento de infarto agudo de miocardio (IAM), accidente cerebrovascular isquémico agudo, y la embolia pulmonar. La Activase se administra por vía intravenosa. Para el manejo y el tratamiento del IAM, existen dos regímenes de dosificación: la infusión acelerada y la infusión de 3 horas. En la infusión acelerada, para pacientes con un peso > 67 kg, se administran

100mg como un bolo intravenoso de 15mg, seguido por 50mg infundido durante los siguientes 30 minutos, y luego 35mg infundido durante los próximos 60 minutos. Para los pacientes que pesan menos que o 67 kg, la dosis recomendada se administra como un bolo intravenoso de 15mg, seguido de 0.75mg/kg infundido durante los próximos 30 minutos que no exceda de 50mg y, a continuación 0.5mg/kg durante los próximos 60 minutos que no exceda de 35mg. En la infusión de 3 horas, la dosis recomendada es 100mg administrados como 60mg en la primera hora, 20mg en la segunda hora, y 20mg más de la tercera hora. Los regímenes de dosificación de alteplasa en el tratamiento de otra enfermedad también se puede encontrar en Physician's Desk Reference, (56va ed., 2002, 57va ed., 2003, y 58va ed., 2004).

0288 En otra realización, el complejo molecular de la invención puede comprender un factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF), tales como Leukine® (Berlex). Leukine® puede ser utilizado, por ejemplo, seguido de quimioterapia de inducción en la leucemia mielógena aguda, en movilización y después de un trasplante de células progenitoras de sangre periférica autólogas, en la reconstitución mieloide después del trasplante autólogo de médula ósea, en la reconstitución mieloide después de un trasplante alogénico de médula ósea, y en el fallo de trasplante de médula ósea o retraso del injerto. Los regímenes de dosis para diferentes enfermedades pueden variar. En un ejemplo, cuando se usa Leukine® posterior al trasplante de células progenitoras de sangre periférica, la dosis recomendada es 250mcg/m²/día administrada por vía intravenosa a lo largo de 24 horas o por vía subcutánea una vez al día comenzando inmediatamente después de la infusión de células progenitoras y continuando hasta que se alcanza un ANC > 1.500 células/mm³ durante 3 días consecutivos. Otros regímenes de dosificación también se pueden encontrar en Physician's Desk Reference, (56va ed., 2002, 57va ed., 2003, y 58va ed., 2004).

0289 En otra realización, el complejo molecular de la invención puede comprender un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), como Neupogen®. Neupogen® puede usarse, por ejemplo, en pacientes con cáncer que reciben quimioterapia mielosupresora, pacientes con leucemia mieloide aguda que reciben quimioterapia de inducción o de consolidación, pacientes con cáncer que reciben trasplante de médula ósea, pacientes sometidos a recolección de células progenitoras de sangre periférica y terapia, y pacientes con neutropenia crónica severa. Los regímenes de dosificación son diferentes en diferentes enfermedades. En un ejemplo, los pacientes con cáncer que reciben trasplante de médula ósea pueden recibir 10mcg/kg/día dados como una infusión vía intravenosa de 4 o 24 horas, o como una infusión vía subcutánea continua de 24 horas. Otros regímenes se pueden encontrar en Physician's Desk Reference, (56va ed., 2002, 57va ed., 2003, y 58va ed., 2004).

0290 En otra realización, el complejo molecular de la invención puede comprender una enzima, como la glucocerebrosidasa (Cerezyme® por Genzyme), que se utiliza en enfermedades de deficiencia de enzimas tales como la enfermedad de Gaucher. Cerezyme® se administra por infusión intravenosa durante 1-2 horas. La dosis debe ser individualizada para cada paciente. Las dosis iniciales van desde 2.5U/kg de peso corporal 3 veces a la semana a 60U/kg una vez cada 2 semanas. Otros regímenes se pueden encontrar en Physician's Desk Reference, (56va ed., 2002, 57va ed., 2003, y 58va ed., 2004).

0291 En diversas realizaciones, la oligomerización con lectina según la presente invención puede disminuir la dosis eficaz del fármaco mencionado, por ejemplo, por 1, 5, 10, 20, 50, 100 veces o más. Cuando la dosis del fármaco no se da en unidad de peso, puede ser convertida a la unidad de peso según las especificaciones del fabricante o cualquier método conocido en la materia y la cantidad correspondiente de lectina presente en el complejo molecular puede ser entonces calculada en consecuencia.

5.9.2 Regímenes Terapéuticos

0292 Para cualquiera de las terapias de combinación antes descritas para el tratamiento o prevención de una enfermedad (por ejemplo, cáncer, enfermedades infecciosas, anemia, condiciones inmunosupresivas, deficiencias enzimáticas o deficiencias hormonales), los complejos de la invención se pueden administrar antes de, simultáneamente con, o después de la administración de la modalidad no basada en lectina-glicoproteína. La modalidad no basada en lectina-glicoproteína puede ser cualquiera de las modalidades antes descritas para

el tratamiento o la prevención de cáncer o enfermedad infecciosa (o cualquier otra modalidad de tratamiento que es deseable para tratamiento o prevención de la enfermedad en cuestión).

5 0293 En una realización, los complejos de la invención se administran a un sujeto a razonablemente el mismo tiempo que la otra modalidad. Este método prevé que las dos administraciones se realizan dentro de un marco de tiempo de menos de un minuto a unos cinco minutos, unos sesenta minutos, unas 2 horas, unas 3 horas, unas 4 horas, unas 6 horas, unas 8 horas, o hasta 12 horas entre si, por ejemplo, en la misma visita del médico.

10 0294 En otra realización, los complejos de la invención y una modalidad se administran exactamente al mismo tiempo. En otra realización, los complejos de la invención y la modalidad se administran en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de modo que los complejos de la invención y la modalidad pueden actuar conjuntamente para proporcionar un beneficio mayor que si se administran solos. En otra realización, los complejos de la invención y una modalidad se administran suficientemente próximos en el tiempo a fin de proporcionar el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Cada uno se puede administrar simultáneamente o por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. En una realización, los complejos de la invención y la modalidad son administrados por diversas vías de administración. En una realización, cada uno es administrado por la misma vía de administración. Los complejos de la invención pueden administrarse en los mismos o diferentes sitios, por ejemplo brazo y pierna. Cuando se administran simultáneamente, los complejos de la invención y la modalidad pueden o no ser administrados mezclados o en el mismo lugar de la administración por la misma vía de administración.

20 0295 En una realización preferida, los complejos de la invención se administran de acuerdo con el régimen descrito en la Sección 5.9.1. En diversas realizaciones, los complejos de la invención y otra modalidad se administran con menos de 1 hora de diferencia, a aproximadamente 1 hora de diferencia, 1 hora a 2 horas de diferencia, 2 horas a 3 horas de diferencia, 3 horas a 4 horas de diferencia, 4 horas a 5 horas de diferencia, 5 horas a 6 horas de diferencia, 6 horas a 7 horas de diferencia, 7 horas a 8 horas de diferencia, 8 horas a 9 horas de diferencia, 9 horas a 10 horas de diferencia, 10 horas a 11 horas de diferencia, 11 a 12 horas de diferencia, no más de 24 horas de diferencia o no más de 48 horas de diferencia. En otras realizaciones, los complejos de la invención y otra modalidad se administran de 2 a 4 días de diferencia, de 4 a 6 días de diferencia, 1 semana de diferencia, de 1 a 2 semanas de diferencia, 2 a 4 semanas de diferencia, un mes de diferencia, de 1 a 2 meses de diferencia, o 2 meses o más de diferencia. En realizaciones preferidas, los complejos de la invención y otra modalidad se administran en un marco de tiempo donde ambos están todavía activos. Un experto en la materia será capaz de determinar tal marco de tiempo determinando la vida media de cada componente administrado.

35 0296 En una realización, los complejos de la invención y otra modalidad se administran dentro de la misma visita del paciente. En una realización preferida específica, los complejos de la invención se administran antes de la administración de otra modalidad. En una realización específica alternativa, los complejos de la invención se administran después de la administración de otra modalidad.

40 0297 En ciertas realizaciones, los complejos de la invención y uno o más otras modalidades son cíclicamente administrados a un sujeto. La terapia cíclica implica la administración de los complejos de la invención en un período de tiempo, seguido por la administración de otra modalidad en un período de tiempo y repitiendo esta administración secuencial. La terapia cíclica puede reducir el desarrollo de resistencia a una o más de las terapias, evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias, y/o mejorar la eficacia del tratamiento. En tales realizaciones, la invención contempla la administración alterna de un complejo de la invención seguido por la administración de otra modalidad 4 a 6 días más tarde, preferible 2 a 4 días más tarde, más preferiblemente 1 a 2 días más tarde, en el que dicho ciclo puede repetirse tantas veces como se desee. En ciertas realizaciones, los complejos de la invención y uno o más otras modalidades son alternativamente administrados en un ciclo de menos de 3 semanas, una vez cada dos semanas, una vez cada 10 días o una vez cada semana. En una realización específica, los complejos de la invención se administran a un sujeto dentro de un marco de tiempo de una hora a veinticuatro horas después de la administración de otra modalidad.

El marco de tiempo puede ampliarse aún más a unos pocos días o más si se usa un tipo de liberación lenta o continua del sistema de suministro de la modalidad.

5.9.3 Formulaciones y Uso

- 5 0298 Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden ser formuladas de manera convencional usando uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables.
- 0299 Así, los complejos y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para administración por inhalación o insuflación (a través de la boca o la nariz), oral, bucal, parenteral, intradérmica, mucosa, subcutánea, intravenosa, rectal, o administración transdérmica. También se contemplan métodos no invasivos de administración.
- 10 0300 Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato de hidrógeno y calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sódico), o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Los comprimidos pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la materia. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden ser presentadas como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados) y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones pueden contener también sales tampón, aromatizantes, colorantes y agentes edulcorantes, según proceda.
- 15 20 25 0301 Las preparaciones para administración oral pueden ser convenientemente formuladas para proporcionar una liberación controlada de los complejos activos.
- 0302 Para la administración bucal las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.
- 30 0303 Para administración por inhalación, los complejos para uso según la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida.
- 35 Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla de polvo de los complejos y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.
- 40 0304 Los complejos se pueden formular para administración parenteral por inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo agua estéril apirógena, antes de su uso.
- 45 0305 Los complejos también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

0306 En adición a las formulaciones descritas anteriormente, los complejos se pueden formular también como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los complejos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrofóbicos (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

0307 Las composiciones pueden, si se desea, ser presentadas en un envase o dispositivo dispensador que puede contener uno o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo, lámina de metal o plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para su administración.

0308 También se abarca el uso de adyuvantes en combinación con o en mezcla con los complejos de la invención. Los adyuvantes contemplados incluyen pero no están limitados a adyuvantes de sales minerales o adyuvantes de gel de sales minerales, adyuvantes de partículas, adyuvantes de micropartículas, adyuvantes mucosales, y adyuvantes inmunoestimulantes, tales como los descritos en la Sección 5.8. Los adyuvantes se pueden administrar a un sujeto como mezcla con complejos de la invención, o utilizarse en combinación con los complejos como se describe en la Sección 5.9.2.

0309 También se contempla el uso de Difosfato de adenosina (ADP) en combinación o en mezcla con los complejos de la invención, preferiblemente complejos gp96.

5.9.4 Kits

0310 La invención también proporciona kits para llevar a cabo los regímenes terapéuticos de la invención. Tales kits comprenden uno o más recipientes con cantidades terapéutica o profilácticamente eficaces de los complejos moleculares de la invención en forma farmacéuticamente aceptable. El complejo molécula en un vial de un kit de la invención puede estar en forma de una solución farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, en combinación con solución salina estéril, solución de dextrosa o solución tamponada, u otro fluido estéril farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, el complejo puede ser liofilizado o desecado, en este ejemplo, el kit además comprende opcionalmente en un recipiente una solución farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, solución salina, solución de dextrosa, etc.), preferiblemente estéril, para reconstituir el complejo para formar una solución para fines de inyección.

0311 En otra realización, un kit de la invención comprende además una aguja o jeringa, preferiblemente envasada en forma estéril, para inyectar el complejo, y/o una gasa con alcohol envasada. Se incluyen opcionalmente instrucciones para administración de complejos moleculares de la invención por un médico o por el paciente.

0312 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona kits que comprenden una pluralidad de recipientes cada uno comprendiendo una formulación farmacéutica o composición que comprende una dosis de complejos moleculares de la invención suficientes para una sola administración terapéutica o profiláctica. La invención también proporciona kits que comprenden un recipiente que comprende una glicoproteína inmunológicamente y / o biológicamente activa o un complejo de la misma, y un recipiente que comprende lectina. Opcionalmente, pueden incluirse en los kits instrucciones para la formulación de los complejos oligomerizados de acuerdo con los métodos de la invención.

0313 En una realización específica, un kit comprende un primer recipiente que contiene un complejo molecular purificado, y un segundo recipiente que contiene una modalidad de tratamiento diferente en una cantidad que, cuando se administra antes, simultáneamente con, o después de la administración del complejo molecular en el primer recipiente, es eficaz para mejorar la eficacia global del tratamiento respecto a la eficacia de la administración de cada componente por separado, o es eficaz para disminuir los efectos secundarios del tratamiento (por ejemplo, en comparación con los efectos secundarios observados) cuando cada componente se usa solo. En una realización específica preferida, la invención proporciona un kit que comprende en un

primer recipiente un complejo molecular purificado de la invención que comprende una población de complejos no covalentes peptídicos obtenidos a partir de tejido canceroso de un mamífero y oligomerizado en presencia de Con A; en un segundo recipiente, una composición que comprende un agente quimioterapéutico de cáncer purificado, y en un tercer recipiente, una composición que comprende una citoquina purificada.

5 5.10 Seguimiento de Efectos Durante el Tratamiento

0314 El efecto del tratamiento con los complejos moleculares de la invención puede ser controlado por cualquier método conocido por un experto en la materia. Por ejemplo, mejora o empeoramiento de síntomas y/o resultados de laboratorio, tecnologías de imagen, o empeoramiento de diversos ensayos bioquímicos, todo puede ser usado para controlar el efecto del tratamiento.

- 10 0315 El efecto del tratamiento con los complejos moleculares de la invención en el desarrollo y progresión de enfermedades neoplásicas puede ser controlado por cualquier método conocido por un experto en la materia, incluyendo pero no limitado a medir: a) hipersensibilidad retardada como evaluación de inmunidad celular; b) actividad citolítica de linfocitos T in vitro c) niveles de antígenos tumorales específicos, por ejemplo, antígenos carcinoembrionarios (CEA); d) cambios en la morfología de tumores usando técnicas tales como una tomografía
- 15 computarizada (TC), e) cambios en niveles de biomarcadores putativos de riesgo para un determinado tipo de cáncer en sujetos en alto riesgo, y f) cambios en la morfología de tumores usando un sonograma.

5.10.1 Prueba Cutánea de Hipersensibilidad Retardada

- 0316 Pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada son de gran valor en la inmunocompetencia general y la inmunidad celular a un antígeno. La incapacidad para reaccionar a una batería de antígenos cutáneos comunes se denomina anergia (Sato, T. et al., 1995, Clin. Immunol. Pathol., 74:35-43).
- 20

- 0317 La técnica apropiada de prueba cutánea requiere que los antígenos sean almacenados estériles a 4°C, protegidos de la luz y reconstituidos poco antes de su uso. Una aguja de calibre 25 o 27 asegura la administración intradérmica, en lugar de subcutánea, del antígeno. Veinticuatro y 48 horas después de la administración intradérmica del antígeno, las mayores dimensiones tanto de eritema e induración se miden con una regla. La hipoactividad para cualquier antígeno o grupo de antígenos dado se confirma probando con mayores concentraciones de antígeno o, en circunstancias ambiguas, por una repetición de la prueba con una prueba intermedia.
- 25

5.10.2 Activación *In Vitro* de Células T Citotóxicas

- 0318 8×10^6 Linfocitos T derivados de sangre periférica aislados por la técnica de centrifugación de gradiente de Ficoll-Hypaque, son re-estimulados con 4×10^4 células tumorales tratadas con mitomicina C en 3 ml de medio RPMI que contiene 10% de suero fetal de ternero. En algunos experimentos, sobrenadante secundario 33% de cultivo mixto de linfocitos o IL-2, se incluye en el medio de cultivo como una fuente de factores de crecimiento de células T.
- 30

- 0319 Con el fin de medir la respuesta primaria de los linfocitos T citolíticos después de la inmunización, las células T se cultivan sin las células tumorales estimuladoras. En otros experimentos, las células T se re-estimulan con células antigénicamente distintas. Después de seis días, los cultivos se analizan para determinar citotoxicidad en un ensayo de liberación de Cr 51 de 4 horas. La liberación de Cr 51 espontánea de las dianas debe alcanzar un nivel inferior al 20%. Para la actividad bloqueante anti-MHC de clase I, se añade un sobrenadante concentrado diez veces de hibridoma W6/32 al ensayo a una concentración final de 12,5% (Heike M., et al., J. Inmunoterapia, 15:165-174).
- 35
- 40

5.10.3 Niveles de Antígenos Específicos de Tumores

0320 Aunque puede no ser posible detectar antígenos tumorales únicos en todos los tumores, muchos tumores muestran antígenos que los distinguen de las células normales. Los reactivos de anticuerpos monoclonales han permitido el aislamiento y la caracterización bioquímica de los antígenos y han sido muy valiosos

diagnósticamente para la distinción de células transformadas y no transformadas y para la definición del linaje celular de las células transformadas. Los antígenos asociados a tumores humanos mejor caracterizados son los antígenos oncofetales. Estos antígenos se expresan durante la embriogénesis, pero están ausentes o son muy difíciles de detectar en el tejido adulto normal. El antígeno prototipo es antígeno carcinoembrionario (CEA), una glicoproteína que se encuentra en el intestino fetal y en células humanas de cáncer de colon, pero no en células adultas normales de colon. Dado que CEA se desprende de células de carcinoma de colon y se encuentra en el suero, se pensó originalmente que la presencia de este antígeno en el suero podría ser utilizado para examinar pacientes del cáncer de colon. Sin embargo, los pacientes con otros tumores, como cáncer de páncreas y cáncer de mama, también tienen niveles séricos elevados de CEA. Por lo tanto, el monitoreo de la caída y elevación de los niveles de CEA en pacientes con cáncer sometidos a terapia ha demostrado ser útil para predecir progresión del tumor y respuesta al tratamiento.

0321 Varios otros antígenos oncofetales han sido útiles para el diagnóstico y control de tumores humanos, por ejemplo, alfa-fetoproteína, una alfa-globulina secretada normalmente por el hígado fetal y células del saco vitelino, se encuentra en el suero de pacientes con enfermedad hepática y tumores de células germinales y se puede utilizar como un marcador del estado de la enfermedad.

5.10.4 Tomografía Computarizada (TC)

0322 TC sigue siendo la elección de técnicas para la clasificación correcta de los cánceres. TC ha demostrado ser más sensible y específica que cualquier otra técnica de imagen para la detección de metástasis.

5.10.5 Medición de Biomarcadores Putativos

0323 Los niveles de un biomarcador putativo para el riesgo de un tipo específico de cáncer se miden para controlar el efecto del complejo molecular de la invención. Por ejemplo, en sujetos con mayor riesgo de cáncer de próstata se mide el suero de antígeno específico de próstata (PSA) por el procedimiento descrito por Brawer, M.K., et. al., 1992, J. Urol., 147:841-845, y Catalona, W.J., et al., 1993, JAMA, 270:948-958; o en sujetos con riesgo de cáncer colorrectal, CEA se mide como se describió anteriormente en la Sección 5.10.3, y en sujetos con mayor riesgo de cáncer de mama, 16 - hidroxilación de estradiol se mide por el procedimiento descrito por Schneider, J. et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 79:3047-3051.

5.10.6 Sonograma

0324 Un sonograma sigue siendo una alternativa de elección de la técnica para la clasificación exacta de cánceres.

6. EJEMPLO 1: NIVELES CONSTANTEMENTE ELEVADOS DE CON A EN LOTES DE COMPLEJO GP96-PEPTIDO HUMANO

0325 Homogeneizados de tejido de cuatro muestras independientes tumorales renales humanas (A a D) se prepararon y procesaron por cromatografía en columna de Con A. La Con A eluida se dividió y la mitad del material se apartó. La muestra restante fue cambiada de tampón a PBS (columna PD-10) y, a continuación ambas muestras purificadas adicionalmente en columnas DEAE separadas que producen dos productos finales homogeneizado en concordancia - uno producido sin cambio de tampón (sin Bx) entre Con A y columnas DEAE y uno producido con una etapa de cambio de tampón (Bx) entre las dos columnas. Un ELISA sensible para detectar Con A fue a continuación utilizado para determinar la concentración de Con A en estas muestras separadas de gp96-péptido. ELISA Concanavalina A específico:

0326 Materiales: Concanavalina A era de Sigma, Catálogo # C7275. Anticuerpo de captura: anti Con A de ratón Cat# MAB 158 Biotecnología Maine, anticuerpo primario: anti Con A de conejo Cat# C7401 Sigma, anticuerpo de detección: Cabra anti IgG-HRP de conejo Cat# 111-035-144 Jackson ImmunoResearch. 0.1M de NaHCO₃ pH 9.6. Tampón de Lavado PBST PBS+0.05% de Tween 20. Tampón de Bloqueo: 2% Leche Descremada en Polvo en Tampón de Lavado (PBST). Metil a-D-manopiranosido (a-MM), USB Cat# 19115. Diluyente de

Muestra: PBS más 1% de BSA y 10% de MMP. TMB Micropocillos Sustrato, Cat# 50-76-05 KPL. Solución de Parada, Cat # 50-85-05 KPL

0327 Métodos: las placas se recubrieron con 2µg/mL anti-Con A de ratón en 0.1M de NaHCO₃ pH 9.6 y se incubó durante la noche a 4°C. La placa se lavó (PBS-Tween) y posteriormente bloqueado (1% de BSA / PBS) a 37°C durante 1 hora y se lavó a continuación. Las muestras y 100µl/pocillo, se incubaron (37°C durante 1 hora) y la placa se lavó. Se añadió anti-Con A de conejo en 1% de BSA + 10% a-MM y la placa se incubó a 37°C durante 1 hora y después se lavó. Se añadió anticuerpo de detección de cabra anti conejo IgG-rábano peroxidasa 1: 5000 en tampón de bloqueo y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 0.5 horas y se lavó a continuación. Se añadió entonces sustrato TMB a cada pocillo, la placa se incubó (TA, 10 min), se añadió solución de parada y la placa se observó a 450nm.

0328 Resultados: gp96 purificada de un homogeneizado común usando un proceso que incluye el paso de intercambio de tampón tenían niveles más altos de Con A que la muestra correspondiente gp96-homogeneizado en concordancia producida con la omisión del paso de intercambio de tampón (Figura 1).

7. EJEMPLO 2: CON A ESTÁ PRESENTE EN UN COMPLEJO MOLECULAR OLIGOMERIZADO

0329 Un homogeneizado común de tejido de fibrosarcoma murino inducido químicamente (Meth A) fue preparado y procesado por cromatografía en columna Con A. La Con A eluida se dividió y la mitad del material se apartó. La muestra restante fue cambiada tampón a PBS y luego ambas muestras purificadas en columnas DEAE separadas que producen dos productos finales homogeneizados en concordancia - uno producido sin cambio de tampón (sin Bx) y uno producido con un paso de intercambio de tampón (Bx) entre las columnas Con A y DEAE. Ambas muestras, junto con una muestra libre de Con A (5µg, 50µg/mL) fueron fraccionadas por SEC en una columna Superdex 200 (Alta, media y baja, respectivamente). Las fracciones recogidas se analizaron para gp96 por SDS-PAGE (fracciones 1 a 8; recuadro) y el contenido de Con A en las fracciones individuales evaluado por un ELISA directo contra Con A (fracciones 1 a 14; superposición) (Para ELISA directo contra Con A, ver Ejemplo 1). Poco Con A se encontró en la preparación sin Bx-gp96 mientras que la gp96 producida con Bx mostró tener Con A en fracciones 1 a 5. Con A libre eluyó mucho más tarde sugiriendo que la Con A presente en la muestra Bx-gp96 no era libre, sino asociada a una especie de alto peso molecular.

0330 Para verificar que gp96 estaba oligomerizada con Con A, un homogeneizado común de tejido de fibrosarcoma murino inducido por Meth A fue preparado y procesado usando un proceso que incluyó Con A y cromatografía de columna DEAE. La gp96 purificada final se dividió en dos. Para una mitad del material, se añadió Con A exógeno a una concentración final de 50µg/mL; se añadió tampón solo a la otra como control, ambas muestras se incubaron a 37°C durante 2 horas y después se fraccionaron por SEC (Superdex 200). Las fracciones individuales se analizaron por SDS-PAGE, y por ELISA específico de Con A y gp96. Los datos analíticos para el material producido sin la etapa de intercambio de tampón se muestran en el panel izquierdo; al que Con A fue añadido a la derecha. En el panel de la izquierda del pico de gp96 está en la fracción 5 y los niveles de Con A detectados por ELISA específico son bajos. En el panel de la derecha (Con A añadido) dos picos de gp96 son evidentes como se muestra por SDS-PAGE (recuadro; fracciones de pico 3 (flecha) y 5) y gp96 ELISA (fracciones 3 y 5) así como un pico de Con A centrado en la fracción 3. Con A medió un cambio en la posición de elución de gp96.

8. EJEMPLO 3: LA OLIGOMERIZACIÓN SE CORRELACIONA CON POTENCIA *IN VITRO* e *IN VIVO*

8.1 El contenido de Con A se Correlaciona con Potencia *In Vitro* para Muestras de gp96 Humana

0331 Las muestras de gp96 de cuatro muestras tumorales humanas renales independientes (A a D) se prepararon como se describió anteriormente (ver Fig. 1) generando cuatro muestras pareadas que sólo difieren en la inclusión u omisión de una etapa de intercambio de tampón entre columnas Con A y DEAE. Todas las ocho muestras se analizaron para el contenido de Con A (panel A; ver también Fig. 1.) junto con la representación de antígeno *in vitro* utilizando el sistema CD71 (Panel B). En cada caso, el material preparado por el proceso que incluye la etapa de intercambio de tampón (y que contiene niveles elevados de Con A) tuvo

una mayor actividad de representación *in vitro* que una muestra generada a partir del tumor coincidente homogeneizado y preparado por un paso en el que la etapa de intercambio de tampón fue omitida.

Ensayo de representación CD71 *in vitro*:

5 0332 Materiales: la línea celular que presenta antígeno, RAW264.7 (ATCC # TIB-71), se utilizó en estos experimentos. Es una de línea celular de macrófagos transformado por virus de Abelson de leucemia murina, que se originó a partir de la cepa BALB/c (H-2d). Se generó un hibridoma de células T por fusión de células T BALB/c específicas para CD71 humano 9-mero con células de timoma BWαβ⁺. Las células T se fusionaron con células BWαβ⁺ por PEG y se seleccionaron en medio HAT. Las células de hibridoma T-T resultantes fueron examinadas entonces para especificidad de CD71 9-mero midiendo la producción de IL-2 por proliferación de células HT-2 después de estimulación antigénica. El medio utilizado fue RPMI 1640 (Gibco-BRL). Se purificó gp96 humano de tumores renales humanos utilizando ambos procesos de intercambio de tampón y de no intercambio de tampón y también un método de columna scFv como se ha descrito (Arnold-Schild et al., Supra). gp96-CT26 murino, purificado a partir de tumor CT26 usando el mismo protocolo de purificación como muestra de ensayo y péptido CD71 9mero murino (TYEALTQKV) fueron utilizados como controles negativos de antígenos. CD71 9mero humano (TYKELIERI) se utilizó como control positivo de antígeno.

0333 Preparación de gp96 derivado de tumor humano: gp96 derivado de humano se purificó a partir de tumores renales humanos. Brevemente, los tumores se homogeneizaron y clarificaron por centrifugación. El sobrenadante libre de células se sometió a precipitación con sulfato amónico al 50%. El sobrenadante resultante se purificó adicionalmente usando cromatografía de Con A y DEAE. La proteína se esterilizó por filtración (0.22 Pm), alícuotada, y almacenada a -80±20°C hasta su uso.

0334 Ensayo de re-presentación: en una placa de 96 pocillos de fondo plano, se co-cultivaron hibridomas de células T específicas de CD71 humanas (5×10^4) con células RAW264.7 (5×10^4). Se añadieron por triplicado concentraciones deseadas de gp96 humana, comnzando desde 150 µg/ml y titulando hacia abajo. Se añadieron controles positivos y negativos apropiados, y el volumen del medio se ajustó para alcanzar un volumen final de 200µL. En adición a la placa de ensayo que contiene tanto los hibridomas de células T como APCs, se añadieron como controles placas que contienen solo hibridomas de células T, o sólo APCs,. Las placas se agitaron ligeramente golpeando antes de colocarlas a 37°C en un incubador de CO₂ al 5% durante 20 horas. Después de la incubación, las células se granularon a 1000 RPM durante 5 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron transferidos a placa de 96 pocillos de fondo redondo y se ensayaron para producción de IL-2 por ELISA (R&D).

8.2 El Contenido de Con A se Correlaciona con Potencia *In Vivo* en el Sistema CT 26 Murino

0335 Las muestras de gp96 de dos muestras de tumores CT26 murinos independientes (Preps A y B) se prepararon como se ha descrito anteriormente para muestras derivados de tumores humanos (ver Fig. 1). Las cuatro muestras se analizaron para contenido de Con A (Panel A) y representación de antígeno *in vitro* utilizando el sistema CT26 (Panel B). En cada caso, el material preparado por el proceso que incluye la etapa de intercambio de tampón (y que tiene una mayor cantidad de Con A) tuvo una mayor actividad de representación *in vitro* que una muestra generada a partir del homogeneizado tumoral concordante y preparado por un paso en el que la etapa de intercambio tampón se omitió.

Ensayo de representación de antígeno CT26 *in vitro*:

40 0336 Materiales: la línea celular que presenta antígeno, RAW264.7 (ATCC # TIB-71), se utilizó en estos experimentos. Es una línea celular de macrófagos transformado por virus de Abelson de leucemia murina, que se originó de la cepa BALB/c (H-2d). Linfocitos T citotóxicos (CTLs): Las se obtuvieron células T específicas para el péptido de tumor CT26 del University of Connecticut Medical Center. Estas células T son específicas para el epítipo AH1, secuencia de aminoácidos SPSYVYHQF. Estos CTLs son re-estimulados una vez por semana con el péptido AH1 9 mero más esplenocitos irradiados con BALB/c. Se utilizó medio de cultivo de tejido AIM V (Gibco-BRL). Este es un medio libre de suero que no contiene proteasas. Las proteasas son

indeseables ya que pueden digerir péptidos alargados a un tamaño menor capaces de sobrecarga sobre molécula MHC induciendo una respuesta CTL independiente de la representación de antígeno. Se purificó gp96 derivada de CT26 a partir de tumores de ratón utilizando ambos procesos de intercambio de tampón y de no intercambio de tampón. AH1 19mero (RVTYHSPSYVYHQFERRAK) solo se añadió como control negativo, así como gp96 derivado de órganos normales de ratón. Se utilizó como control positivo AH1 9mero (SPSYVYHQF), que puede sobrecargar y cebar para el reconocimiento de CTL. Un control positivo adicional incluyó gp96 derivado de ratón complejado con péptido AH1 19mer.

0337 Métodos:

0338 Preparación de gp96 Derivado de CT26: gp96 derivado de CT26 fue purificado a partir de tumores sólidos. El tumor de ratón se homogeneizó y aclaró por centrifugación. El sobrenadante libre de células se sometió a una precipitación con sulfato amónico al 50%. El sobrenadante resultante se purificó adicionalmente mediante cromatografía de Con A y DEAE. La proteína se esterilizó por filtración (0.22 Pm), se tomaron alícuotas y se almacenaron a $-80\pm 20^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

0339 Preparación de complejos gp96-AH1 19mero (muestras de complejo de control positivo): péptido AH1 19mero, disuelto en H_2O , se añadió a gp96 en una relación molar 50:1. Las muestras fueron brevemente mezcladas en un tubo cónico de 15 ml en un volumen de aproximadamente 1 a 2ml, dependiendo de qué cantidad de proteína está siendo complejada, y colocadas a 37°C durante 0.5 horas. Después de la incubación, las muestras se lavaron 4X con 5ml de PBS utilizando una unidad de filtro giratorio 30K MWCO Centricon (Millipore) y se analizaron para la concentración de proteína por el ensayo de Bradford.

0340 Preparación de AH1-9mero (muestras de ensayo de control positivo): AH1 9mero puede cargarse directamente en moléculas MHC I, por lo tanto, se utilizó como control positivo para estimular directamente células T sin procesamiento por APCs.

0341 Las muestras negativas de control incluyeron gp96 no complejado o péptido 19mero desnudo disuelto en PBS a la misma concentración molar.

0342 Ensayo de re-presentación: células T específicas de péptido AH1 (8 días de post-estimulación) se lavaron 3 veces para eliminar las APCs, y re-suspendieron en medios AIM V a 2×10^5 células/ml. Células RAW 264.7 fueron utilizadas como APCs, y lavadas una vez en DMEM más 10% de FCS, antes de re-suspender a 2×10^5 células/ml en AIM V. En una placa de 96 pocillos de fondo redondo muestras de gp96 derivadas de CT26 se agregaron por cuadruplicado y se hizo una dilución en serie dos veces ($200\mu\text{g/ml}$ - $6.25\mu\text{g/ml}$). Se añadieron controles positivos y negativos apropiados, así como la cantidad de AIM V necesaria para alcanzar un volumen final de $250\mu\text{l}$. En cada pocillo fueron co-cultivadas 1×10^4 células T con un número igual de APCs. Las placas que contenían sólo células T fueron utilizadas como controles. Las placas se incubaron a 37°C y CO_2 al 5% durante 18 horas.

0343 Después de la incubación, las células se peletizaron por centrifugación a 1000rpm durante 5 minutos a 4°C . Los sobrenadantes se transfirieron a placas de 96 pocillos de fondo plano para ELISA y se almacenaron a -20°C . Los niveles de IFN- γ se midieron por ELISA (Sistemas R&D).

8.3 El contenido Con A se Correlaciona tanto con la Actividad *in vitro* en el Ensayo de Representación Meth A y la Potencia *in vivo* en el Modelo de Protección del Tumor Meth A Murino

0344 Dos preparaciones Meth A gp96 separadas se preparon a partir de un homogeneizado tumoral común (antes descrito) generando una muestra pareada que difiere únicamente en la inclusión u omisión de una etapa de cambio de tampón entre columnas Con A y DEAE. Estas muestras se analizaron por ELISA Con A para el contenido Con A (Panel A), la actividad *in vitro* en el ensayo de representación Meth A (Panel B) e *in vivo* en el ensayo de protección tumoral Meth A a una dosis de $10\mu\text{g}$ (Panel C). Meth A gp96 preparado por un proceso que incluye una etapa de cambio de tampón entre columnas Con A y DEAE había aumentado el contenido de Con A, mayor representación *in vitro* de antígeno y mayor actividad *in vivo* de protección tumoral sobre el preparado por un proceso en el que se omitió la etapa de intercambio de tampón.

Representación de antígeno de Meth A *in vitro*:

0345 Materiales: esplenocitos BALB/c irradiados se utilizaron como Células Presentadoras de Antígenos (APCs). Se utilizó el clon de célula T CD4+ específica de Meth A, 24d3. Están restringidos por I-Ed de molécula MHCII, y son específicos para el péptido antigénico contenido dentro de la secuencia EYELRKHNFSDTG. El medio utilizado para este ensayo fue RPMI 1640 (Gibco-BRL). La gp96 se purificó a partir de tumores Meth A de ratón utilizando ambos procesos de intercambio de tampón y de no intercambio de tampón. La forma de tipo salvaje del péptido L11 (EYELRKNNFSDTG) se usó como control negativo, y la forma mutada del péptido L11 (EYELRKHNFSDTG) se utilizó como control positivo.

0346 Métodos:

- 10 0347 Preparación de gp96 derivado de Meth A: gp96 derivado de la Meth A se purificó de tumores sólidos. Se homogeneizó tumor de ratón y se aclaró por centrifugación. El sobrenadante libre de células se sometió a precipitación con sulfato amónico al 50%. El sobrenadante resultante se purificó adicionalmente usando cromatografía de Con A y DEAE. La proteína se esterilizó por filtración (0.22 μ m), se tomaron alícuotas y almacenaron a $-80\pm 20^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.
- 15 0348 Ensayo de re-presentación: 2×10^4 de clones de células T CD4+ específicas de Meth A (24d3) se incubaron con 5×10^5 de APCs esplénicas BALB/c irradiadas en presencia de diversas concentraciones de gp96 derivado de Meth A o de otras fuentes (100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ de concentración final) durante 48-72hrs en la placa de 96 pocillos de fondo plano en 200 μl de volumen final. Se añadió péptido L1 de proteína ribosomal tipo salvaje y péptido L1 de proteína ribosomal mutado en pocillos replicados y utilizados como control negativo o positivo, respectivamente. Después de 48-72 horas de incubación a 37°C , CO_2 al 5%, se tomaron 100 μl de sobrenadante y la producción de IL-5 se midió por ELISA.

Ensayo de Inhibición de Tumor Meth A *In Vivo*:

- 25 0349 Ensayo de inhibición de crecimiento de Meth A *in vivo*: Ratones BALB/c ($n=30$ / grupo) fueron inmunizados en el día 0 y el día 7 con 10 o 50 μg de gp96 por vía intradérmica en el flanco. El día 14 del estudio, los ratones fueron abordados con 1×10^5 células Meth A por vía intradérmica en un volumen total de 100 μl . Los tumores de crecimiento fueron controlados durante las siguientes cuatro semanas. Todos los animales fueron sacrificados en el día de estudio 41 después de una medición final del tumor. Los datos se informaron en porcentaje de animales libres de tumor en el día de estudio 41. Los grupos de control incluyeron no inmunizados (diluyente - control negativo) e inmunizados con células Meth A irradiadas (control positivo).

30 9. EJEMPLO 4: CON A EXÓGENO AUMENTA LA ACTIVIDAD DE GP96 EN EL ENSAYO DE REPRESENTACIÓN DE CD17 IN VITRO

0350 Se homogeneizó y centrifugó tejido hepático humano produciendo un sobrenadante 11K que se dividió en 3 muestras idénticas y procesó por diferentes métodos.

- 35 0351 Dos muestras se procesaron por cromatografía en columna de Con A (ver Sección 5.13), el aluato de Con A se dividió y la mitad del material se apartó. La muestra restante fue cambiada de tampón (ver Sección 5.13) a PBS y luego ambas muestras se purificaron en columnas DEAE separadas produciendo dos productos finales homogeneizados en concordancia uno producido sin cambio de tampón (NO Bx - muestra A) y uno producido con un paso de cambio de tampón (Bx - muestra B) entre las columnas Con A y DEAE (Figura 7).

- 40 0352 El sobrenadante 11K restante se usó para purificar gp96 utilizando columna scFv gp96-específica como se describe en Arnold-Schild et al., Cancer Research, 2000, 60(15):4175-4178 (referido como "Arnold-Schild" en adelante). La purificación se realizó como sigue: cinco mg de scFv anti-gp96 se acoplaron a 0.5 mg de Sepharose CNBr-activada (Pharmacia) (Para la producción de scFv anti-gp96, ver Arnold-Schild, o puede hacerse por cualquier método bien conocido en la materia). Los sobrenadantes 11K se aplicaron a la columna scFv anti-gp96. Después de lavado abundante con PBS, gp96 se eluyó con PBS, 1.3 M NaCl, 10 mM de acetato sódico (pH 7.2).
- 45

0353 Todas las muestras se analizaron para la concentración de Con A por un ELISA específico de Con A (Con A exógeno (7.5ng Con A/ μ g proteína total) se añadió a ambas muestras A y D a niveles equivalentes a los de la muestra B) y para la representación de antígeno *in vitro* en el sistema CD71 a una concentración de proteína de 75 μ g/mL. Para muestras pareadas coincidentes, el material producido por el proceso que incluye la etapa de intercambio de tampón (Muestra # 1; contenido de Con A 7.5 ng/ μ g de proteína total) era más activo *in vitro* que el material producido por un proceso en el que se omitió la etapa de intercambio de tampón (muestra A; contenido de Con A 0.43ng/ μ g de proteína total) (Figura 7). El material producido por un método de paso único que no utilizó un paso de purificación en columna Con A (scFv gp96; 0 ng/ μ g) tuvo baja actividad *in vitro* similar a la muestra A (Figura 7). La adición de con A exógeno a las muestras A y C a niveles equivalentes a los de la muestra B (7.5ng Con A/ μ g proteína total), aumentó la actividad específica de representación *in vitro* de antígeno a un nivel similar al presente en la muestra B (Figura 7). Este nivel de Con A no tuvo ningún efecto sobre las células T solas.

10. EJEMPLO 5: LA ESPECIE OLIGOMÉRICA ES SENSIBLE A METIL ALFA-D MANOPIRANOSIDO (ALFA-MM)

0354 Una muestra gp96 meth A se purificó por el procedimiento de purificación estándar, incluyendo cromatografía de Con A y DEAE y la proteína se analizó por SEC analítico utilizando una columna Superose 6 (Pharmacia) que mostró que la preparación de proteína contenía principalmente gp96 dimérica (gp96 T=0). Con A se añadió (50 μ g/mL final) a una alícuota de esta muestra gp96 (conc. 500 μ g/ml), la muestra se incubó a temperatura ambiente y se tomaron muestras cada hora (T = 1 a T = 5) y se analizaron por SEC. Una muestra comprendiendo Con A sola también fue trabajada. La adición de Con A medio un cambio en la posición de elución de pico del dímero gp96 que cambió sólo ligeramente tras el primer punto temporal. gp96 solo no cambió durante este período de tiempo (gp96, T=5). Tras el punto temporal final, se tomaron dos alícuotas separadas de la muestra final de 5hr y se añadió un volumen igual de PBS o PBS conteniendo 10% α -MM. Cada muestra fue re-analizada por SEC. Ningún cambio fue evidente en la muestra a la que se añadió PBS (no mostrado). La adición de α -MM disoció el complejo de alto peso molecular (gp96 + Con A T=5 + α -MM), resultando que el perfil de SEC era semejante al de la muestra de gp96 original (gp96, T=0 o T=5).

11. EJEMPLO 6: BAJA CON A: ESTEQUIOMETRIAS DE GP96 MEDIAN UN CAMBIO SENSIBLE SEC EN LA POSICION DE ELUCION DE GP96

0355 Se purificó gp96 de tumor renal humano por el procedimiento de purificación estándar, incluyendo cromatografía de Con A y DEAE y la proteína fue analizada por SEC analítico utilizando una columna Superose 6 (Pharmacia). Con A se añadió a una concentración final de 0.005 - 50 μ g/mL a gp96 (180 μ g/mL), la muestra se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y se analizó por SEC. Estequiometrías de alrededor de 1Con A: 10 gp96, son capaces de generar un cambio sensible a SEC en la posición de elución de gp96.

12. EJEMPLO 7: ADICIÓN DE METIL METIL ALFA-D-MANOPIRANÓSIDO CAUSA UNA DISMINUCIÓN DEPENDIENTE DE CONCENTRACIÓN EN LA ACTIVIDAD *IN VITRO* DE REPRESENTACIÓN DE ANTÍGENO CT26

0356 Una muestra de gp96 derivada de CT26 (preparada por el proceso Bx) junto con un péptido 9mero de control positivo (SPSYVYHQF) se incubaron durante 30 minutos en presencia de 50, 100 o 400 mM α -MM antes de diluirse (1 en 5) en un pocillo de placa de microtitulación conteniendo células RAW264.7 APC y células T específicas de AH1. Las muestras se incubaron durante la noche y los sobrenadantes resultantes se analizaron mediante un ELISA específico de INF- γ . α -MM provocó una reducción dosis-dependiente en la representación de antígeno CT26 y no tuvo efecto sobre el reconocimiento de células T del péptido 9mero de control positivo. Este nivel de α -MM no afecta las viabilidades de células APC o células T.

13. EJEMPLO 8: CON A AUMENTA LA ACTIVIDAD DE RECHAZO DE TUMOR DE HSPPC-96

13.1 Con A Añadida Durante la Purificación de gp96 Aumenta la Actividad del Producto Purificado Final

0357 Se preparó gp96 derivado de Meth A con diferentes niveles de Con A en el producto final por adición de Con A durante el proceso de purificación. Todas las muestras fueron analizadas por ELISA Con A para el contenido de Con A (la concentración de Con A medida en ng Con A/ μ g para cada muestra se indica en la figura) y rechazo de tumor *in vivo*. La figura 11 muestra los resultados del ensayo de rechazo del tumor Meth A *in vivo*. La adición en proceso de Con A causó un aumento valorable en la actividad de rechazo del tumor de HSPPC-96.

0358 Métodos:

0359 Preparación de gp96 derivado de Meth A y adición en proceso de Con A: Una muestra de un tumor Meth A se homogeneizó (30 mM de tampón fosfato de sodio pH 7.2 conteniendo 2 mM $MgCl_2$ y 2mM AEBSF), clarificado por centrifugación, se añadió sulfato amónico sólido al 50%, la muestra se centrifuga de nuevo y el sobrenadante se aplica directamente a una columna de Con A. En esta etapa, al eluato Con A se cambió el tampón a tampón fosfato salino ("PBS") y se dividió en 6 muestras idénticas. Una muestra fue procesada inmediatamente mediante carga en una columna dietilaminoetil ("DEAE"), lavando esta muestra con fosfato de sodio 10mM, NaCl 260mM y eluyendo con fosfato de sodio 10mM, NaCl 700mM (procedimiento estándar). Para las cinco restantes, se añadió Con A exógeno (niveles uno a cinco de 3 μ g/ml, 10 μ g/ml, 30 μ g/ml, 100 μ g/ml y 300 μ g/ml respectivamente) Todas las muestras fueron luego purificadas sobre columna de DEAE como se describió anteriormente. Todos los eluatos DEAE fueron posteriormente cambiados de tampón a 9% tampón fosfato de sacarosa-potasio pH7.4.

0360 Ensayo de inhibición de crecimiento de Meth A *in vivo*: ratones BALB/c (n=10/grupo) fueron inmunizados en el día 0 y el día 7 con 10 μ g de gp96 por vía intradérmica en el flanco. El día 14 del estudio, los ratones fueron abordados con 1×10^5 células de Meth A por vía intradérmica en un volumen total de 100 μ l. Los tumores en crecimiento fueron controlados durante las siguientes cuatro semanas. Todos los animales fueron sacrificados en el día de estudio 41 después de una medición final del tumor. Los datos se informaron en porcentaje de animales que libres de tumor en el día de estudio 41. Los grupos de control incluyeron no inmunizados (diluyente - control negativo) e inmunizados con células Meth A irradiadas (control positivo).

13.2 Con A Añadida Durante la Purificación de gp96 o Subsecuente a la Purificación de gp96 Aumenta la Actividad del Producto Final Purificado

0361 Se preparó gp96 derivada de Meth A con diferentes niveles de Con A en el producto final bien por adición de Con A durante el proceso de purificación (a niveles de 30 μ g/ml y 300 μ g/ml) o tras la purificación (a un nivel de 30 μ g/ml). Todas las muestras fueron analizadas por ELISA Con A para contenido de Con A (la concentración Con A medida en ng Con A/ μ g para cada muestra se indica en la figura) y rechazo del tumor *in vivo*. Figura 12(A) muestra los resultados del ensayo de rechazo del tumor Meth A *in vivo* para adición de Con A en proceso, y la Figura 12(B) muestra los resultados para adición de Con A al producto final. La adición de Con A, sea en proceso o tras la purificación de gp96 resultó en un incremento en la actividad de rechazo del tumor de HSPPC-96.

0362 Métodos:

0363 Preparación de gp96 derivado de Meth A y adición de Con A: Una muestra de tumor Meth A se homogeneizó (30 mM de tampón fosfato de sodio pH 7.2 conteniendo 2 mM $MgCl_2$ y 2mM AEBSF), se clarificó por centrifugación, se añadió sulfato amónico sólido al 50%, la muestra se centrifugó de nuevo y el sobrenadante se aplicó directamente a una columna de Con A. En esta etapa, el eluato de Con A fue cambiado de tampón a PBS y dividido en 3 muestras. Una muestra fue procesada de inmediato en columna de DEAE para obtener gp96 (procedimiento estándar). Para los dos restantes, se añadió Con A exógeno (30 y 300 μ g/mL respectivamente) y las muestras se purificaron luego sobre columna de DEAE. Todas las muestras DEAE eluidas fueron sometidas a intercambio final de tampón a tampón fosfato de sacarosa-potasio 9% pH7.4. Con A

se añadió (30ug/mL) a una alícuota de la gp96 purificada por el procedimiento estándar. Las muestras se analizaron para contenido de Con A y rechazo del tumor in vivo. Con A causó un aumento en la actividad de rechazo del tumor de gp96 cuando se añadió sea en proceso (Figura 12 (A)) o a la proteína gp96 purificada final (Figura 12 (B)).

- 5 0364 Ensayo de inhibición de crecimiento de Meth A in vivo: ratones BALB/c (n=10/grupo) fueron inmunizados en el día 0 y el día 7 con 10 µg de gp96 por vía intradérmica en el flanco. En el día 14 del estudio, los ratones fueron abordados con 1×10^5 células Meth A por vía intradérmica en un volumen total de 100µl. Los tumores en crecimiento fueron controlados durante las siguientes cuatro semanas. Todos los animales fueron sacrificados en el día de estudio 41 después de una medición final del tumor. Los datos se informaron como porcentaje de animales que están libres de tumor en el día de estudio 41. Los grupos de control incluyen no inmunizados (diluyente - control negativo) e inmunizados con células Meth A irradiadas (control positivo).

- 10 0365 En otro experimento, gp96 derivada de Meth A fue preparada utilizando una columna de inmunoafinidad scFv anti-gp96. La gp96 purificada fue cambiada de tampón a PBS y dividida en varias partes alícuotas. A una alícuota, se añadió Con A. Las muestras se analizaron por ELISA Con A (la concentración de Con A medida en ng Con A/µg para cada muestra se indica en la figura) y para rechazo del tumor in vivo. Los resultados se muestran en la Figura 13. En cada caso, la adición de Con A aumentó la actividad de rechazo del tumor de gp96.

0366 Métodos:

- 20 0367 Preparación de gp96 derivada de Meth A y adición de Con A: Una muestra de tumor Meth A fue homogeneizada (tampón fosfato de sodio 30mM pH 7.2 conteniendo 2mM $MgCl_2$ y 2mM AEBSF), clarificada por centrifugación y filtrada (0.45µM). El homogeneizado aclarado resultante se aplicó a una columna de inmunoafinidad scFv anti-gp96 de 1ml. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna de PBS y la gp96 posteriormente eluida con 5 volúmenes de columna de PBS que contenían 1.3M de NaCl. El eluato de columna fue cambiado de tampón a PBS.

- 25 0368 Ensayo de inhibición de crecimiento de Meth A in vivo: ratones BALB/c (n=10/grupo) fueron inmunizados en el día 0 y el día 7 con 0.3 o 3 µg de gp96 sola o en combinación con Con A intradérmica en el flanco. El día 14 del estudio, los ratones fueron abordados con 1×10^5 células Meth A por vía intradérmica en un volumen total de 100 µl. Los tumores en crecimiento fueron controlados durante las siguientes cuatro semanas. Todos los animales fueron sacrificados en el día de estudio 41 después de una medición final del tumor. Los datos se informaron como porcentaje de animales que están libres de tumor en el día de estudio 41. Los grupos de control incluyeron no inmunizados (diluyente - control negativo) e inmunizados con células Meth A irradiadas (control positivo).

14. EJEMPLO 9: INMUNOTERAPIA DE INFECCIÓN HSV-2

- 35 0369 El virus Herpes Simple tipo 2 ("HSV-2") se cultiva y se aíslan partículas víricas por cualquier serie de métodos conocidos en la materia (ver, por ejemplo, Principios de Virología, Biología Molecular, Pathogenesis, y Control, de Flint et al., ed., ASM Press, (2000)). Se extraen partículas víricas por uno de varios métodos comunes y la muestra resultante se centrifuga y se filtra para obtener una fracción vírica enriquecida en proteína. El grupo inicial de proteínas víricas solubilizadas puede ser cuantificado y añadido un exceso estequiométrico de Con A (u otra lectina). Alternativamente, el extracto de proteína soluble también se puede enriquecer para glicoproteína específica de virus por cromatografía en una columna de Conacavalin A (u otra lectina inmovilizada). Las glicoproteínas son específicamente eluidas de la columna utilizando un inhibidor específico de lectina (como metilo alfa-manopiranosido para Con A). El inhibidor puede eliminarse usando una serie de métodos de intercambio de tampón. La muestra de glicoproteína enriquecida puede luego ser cuantificada y añadido un exceso estequiométrico de Con A. Alternativamente, la muestra de glicoproteína enriquecida puede ser procesada usando métodos enzimáticos o químicos para generar pequeños fragmentos de péptidos de las glicoproteínas. Estos fragmentos más pequeños se pueden mezclar directamente con un exceso estequiométrico de Con A (u otra lectina), o purificados más por cromatografía y elución de una columna

de Con A (u otra columna de lectina inmovilizada). La fracción enriquecida en glicopéptido puede ser cuantificada y añadido un exceso estequiométrico de Con A (u otra lectina). Las muestras y los controles adecuados se evalúan para la actividad biológica utilizando sea modelos profilácticos (murinos VHS-2) o terapéuticos (cobaya VHS-2).

- 5 0370 Metodologías similares se pueden realizar para generar material de ensayo para la evaluación en la inmunoterapia del cáncer.

Equivalencia:

- 10 Muchas modificaciones y variaciones de esta invención se pueden hacer sin apartarse de su espíritu y alcance, como será evidente para los expertos en la materia. Las realizaciones específicas descritas en este documento se ofrecen a modo de ejemplo solamente.

LISTA DE SECUENCIAS

0372

<110> Antigenics, Inc.

<120> Uso de Lectinas para Promover Oligomerización de Glicoproteínas y Moléculas Antigénicas

5 <130> 8449-330-228

<150> 60/450,721

<151> 2003-02-28

<160> 6

<170> PatentIn version 3.2

10 <210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> virus de leucemia murina

<400> 1

Ser Pro Ser Tyr Val Tyr His Gln Phe
1 5

15

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus Musculus

20 <400> 2

Thr Tyr Glu Ala Leu Thr Gln Lys Val
1 5

<210> 3

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile
1 5

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

5 <213> virus de leucemia murina

<400> 4

Arg Val Thr Tyr His Ser Pro Ser Tyr Val Tyr His Gln Phe Glu Arg
1 5 10 15

Arg Ala Lys

<210> 5

<211> 13

10 <212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 5

Glu Tyr Glu Leu Arg Lys His Asn Phe Ser Asp Thr Gly
1 5 10

<210> 6

15 <211> 13

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 6

Glu Tyr Glu Leu Arg Lys Asn Asn Phe Ser Asp Thr Gly
1 5 10

20

REIVINDICACIONES

1. Uno o más complejos no covalentes, cada complejo comprendiendo una proteína de choque térmico, una molécula antigénica, y una lectina, en donde dicha proteína de choque térmico está glicosilada, y donde la cantidad de lectina presente en dichos complejos respecto a la cantidad de proteína de choque térmico es mayor que o igual a 50 nanogramos de lectina por microgramo de proteína de choque térmico o menor que o igual a 5 nanogramos de lectina por microgramo de proteína de choque térmico.
2. Los complejos de la reivindicación 1, en donde la lectina presente en dichos complejos en relación a la cantidad de proteína de choque térmico o glicoproteína es de 50 a 1000 nanogramos de lectina por microgramo de proteína de choque térmico o glicoproteína.
3. Los complejos de la reivindicación 1, en donde la lectina presente en dichos complejos en relación a la cantidad de proteína de choque térmico es de 100 a 500 nanogramos de lectina por microgramo de proteína de choque térmico.
4. Los complejos de la reivindicación 1, en donde la lectina presente en dichos complejos en relación a la cantidad de proteína de choque térmico o glicoproteína es de 0.1 a 1 nanogramo de lectina por microgramo de proteína de choque térmico o glicoproteína.
5. Los complejos de la reivindicación 1, en donde la lectina presente en dichos complejos en relación a la cantidad de proteína de choque térmico es de 0.5 a 1 nanogramo de lectina por microgramo de proteína de choque térmico.
6. Los complejos de la reivindicación 1, en donde la relación molar entre la proteína de choque térmico y la lectina es 3:1, 2:1, o 1:1.
7. Los complejos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha lectina está en forma de un dímero o un oligómero.
8. Los complejos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha lectina es una lectina de unión a manosa.
9. Los complejos de la reivindicación 8, en donde dicha lectina de unión a manosa es Concanavalina A (Con A).
10. Los complejos de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicha proteína de choque térmico se selecciona del grupo que consiste de gp96, Calreticulín, y GRP170.
11. Los complejos de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicha proteína de choque térmico es gp96.
12. Los complejos de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde dichos complejos son purificados.
13. Los complejos de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde dicha molécula antigénica es una molécula antigénica que muestra uno o más determinantes antigénicos contra los que se desea una respuesta inmune en un sujeto.
14. Los complejos de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde un complejo de dicha proteína de choque térmico y dicha molécula antigénica es aislado del tejido canceroso.
15. Los complejos de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde dicha molécula antigénica es un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a tumor.
16. Los complejos de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde dicha molécula antigénica muestra la antigenicidad de un antígeno de un agente infeccioso.

- 17.** Un método de preparación de la población de uno o más complejos no covalentes según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, dicho método comprendiendo las etapas de:
- a) ligar dicha lectina a dicha proteína de choque térmico, y
 - b) complejar dicha proteína de choque térmico a dicha molécula antigénica.
- 5 18.** Un método de preparación de la población de uno o más complejos no covalentes según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, dicho método comprendiendo ligar una lectina a uno o más complejos, cada complejo comprendiendo una proteína de choque térmico glicosilada y una molécula antigénica, en donde dicha lectina no está ligada a una fase sólida.
- 10 19.** El método de la reivindicación 18, que comprende además aislar dichos complejos de proteína de choque térmico y molécula antigénica por cromatografía de afinidad basada en lectina antes de ligar dichos complejos a lectinas.
- 20.** El método de la reivindicación 18, que comprende además aislar dichos complejos de proteína de choque térmico y molécula antigénica por cromatografía no basada en lectina antes de ligar dichos complejos a dicha lectina.
- 15 21.** El método de la reivindicación 20, en donde dicha cromatografía no basada en lectina es cromatografía de afinidad basada en anticuerpos.
- 22.** El método de la reivindicación 18, en el que la lectina se añade durante el proceso de purificar el uno o más complejos no covalentes.
- 20 23.** El método de la reivindicación 19, en el que la lectina se añade durante el proceso de purificar el uno o más complejos no covalentes utilizando una columna de scFv gp96-específica, en el que la proteína de choque térmico en el uno o más complejos no covalentes es gp96.
- 24.** Una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable, y uno o más complejos no covalentes según cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
- 25 25.** La composición farmacéutica de la reivindicación 24, para su uso en un método para el tratamiento o prevención de un cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto.
- 26.** La composición farmacéutica de la reivindicación 24, para su uso como un medicamento.
- 27.** La composición farmacéutica de la reivindicación 26, en la que un complejo de dicha proteína de choque térmico y dicha molécula antigénica es aislado de tejido canceroso.
- 30 28.** La composición farmacéutica de la reivindicación 26, en donde dicha molécula antigénica es un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a tumor.
- 29.** La composición farmacéutica de la reivindicación 26, en donde dicha molécula antigénica muestra la antigenicidad de un antígeno de un agente infeccioso.
- 30.** La composición farmacéutica de la reivindicación 27 o 28, para uso en un método para el tratamiento de un cáncer en un sujeto que tiene cáncer.
- 35 31.** La composición farmacéutica de la reivindicación 29, para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un sujeto que tiene una enfermedad infecciosa.
- 32.** La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 25, 30, o 31, en donde el sujeto es un mamífero.
- 33.** La composición farmacéutica de la reivindicación 32, en donde el mamífero es un humano.

- 34.** El uso de uno o más complejos de la reivindicación 14 o 15, para la elaboración de un medicamento para uso en el tratamiento de un cáncer en un sujeto que tiene cáncer.
- 35.** El uso de uno o más complejos de la reivindicación 16, para la elaboración de un medicamento para uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un sujeto que tiene una enfermedad infecciosa.
- 5 **36.** Una composición que comprende una población de complejos no covalentes, en la que dichos complejos no covalentes son de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
- 37.** La composición de la reivindicación 36 para uso como un medicamento.
- 38.** La composición de la reivindicación 37, en la que un complejo de dicha proteína de choque térmico y dicha molécula antigénica es aislado de tejido canceroso.
- 10 **39.** La composición de la reivindicación 37, en donde dicha molécula antigénica es un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a tumor.
- 40.** La composición farmacéutica de la reivindicación 37, en donde dicha molécula antigénica muestra la antigenicidad de un antígeno de un agente infeccioso.
- 41.** La composición de la reivindicación 38 o 39, para su uso en un método para el tratamiento de un tipo de cáncer en un sujeto que tiene cáncer.
- 15 **42.** La composición de la reivindicación 40, para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un sujeto que tiene una enfermedad infecciosa.
- 43.** La composición de la reivindicación 36, para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de cáncer o una enfermedad infecciosa.
- 20 **44.** Uso de la composición de la reivindicación 38 o 39, para la elaboración de un medicamento para uso en el tratamiento de un cáncer en un sujeto que tiene cáncer.
- 45.** Uso de la composición de la reivindicación 40 para la elaboración de un medicamento para uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un sujeto que tiene una enfermedad infecciosa.
- 46.** Uso de la composición de la reivindicación 36 para la elaboración de un medicamento para el
- 25 **tratamiento o prevención de cáncer o una enfermedad infecciosa.**
- 47.** Un kit que comprende:
- a) un primer recipiente que contiene una composición que comprende una población de complejos no covalentes según cualquiera de las reivindicaciones 1-13,
- b) un segundo recipiente que contiene una lectina purificada.
- 30 **48.** El kit de la reivindicación 47, en el que la molécula antigénica muestra la antigenicidad de un antígeno de un cáncer o de un antígeno de un agente de una enfermedad infecciosa.
- 49.** El kit de la reivindicación 47, en el que la lectina es una lectina de unión a manosa.
- 50.** El kit de la reivindicación 47, en el que la lectina de unión a manosa es Concanavalina A (Con A).
- 51.** El kit de cualquiera de las reivindicaciones 47-50, en el que la proteína de choque térmico se selecciona
- 35 **del grupo que consta de gp96, Calreticulín, y GRP170.**
- 52.** El kit de cualquiera de las reivindicaciones 47-50, en el que la proteína de choque térmico es gp96.

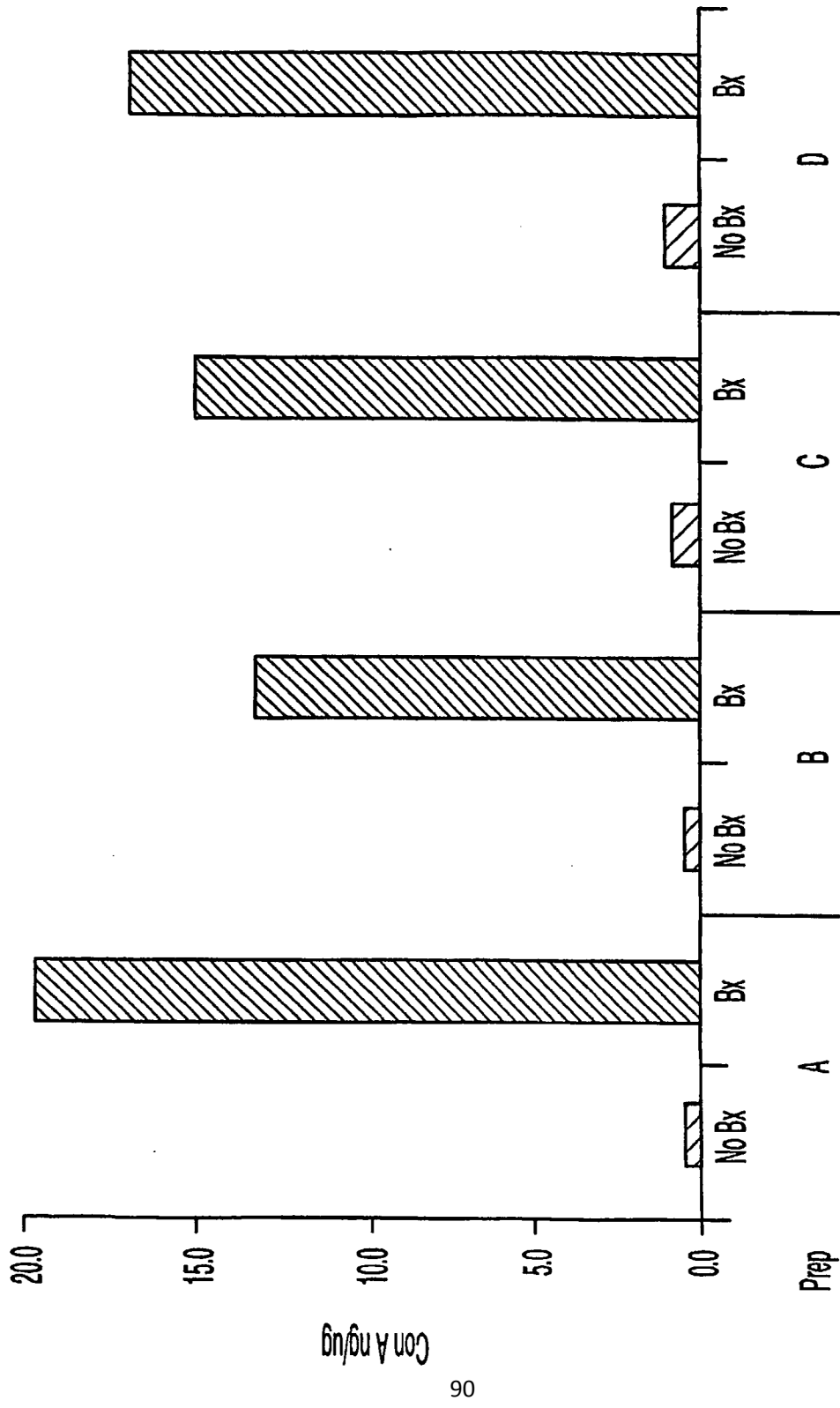


Fig. 1

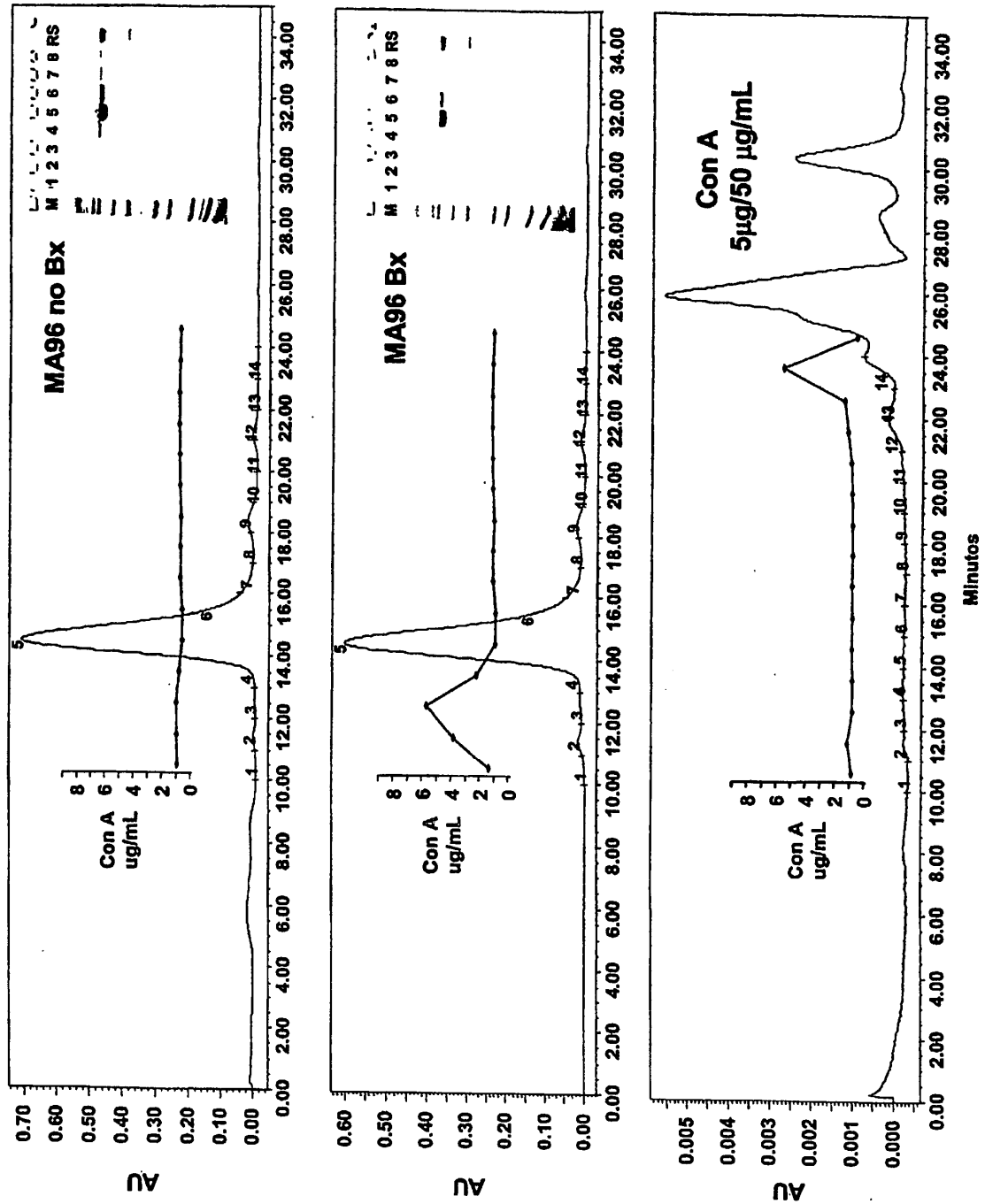
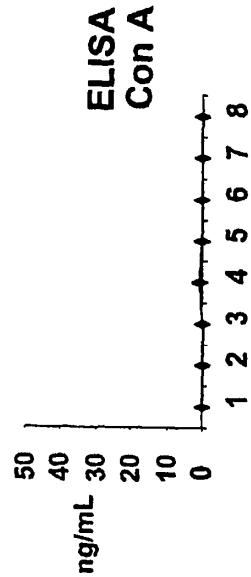
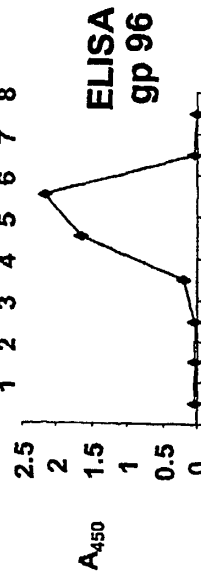
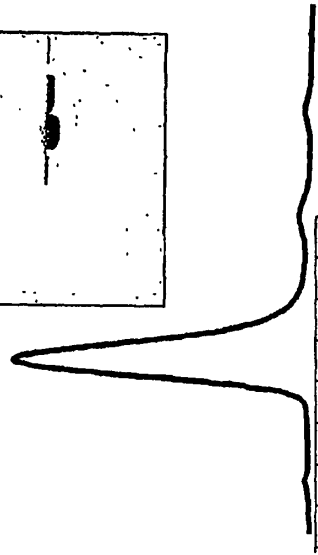
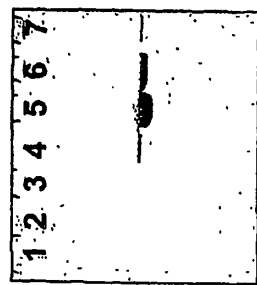


Fig. 2

ONCOPHAGE



ONCOPHAGE + Con A

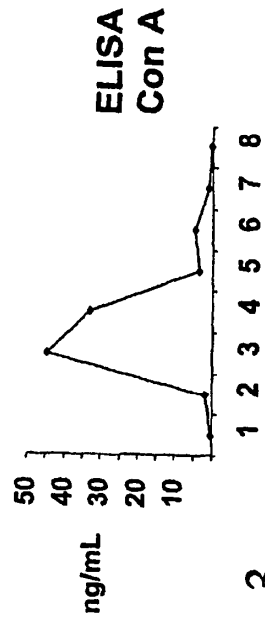
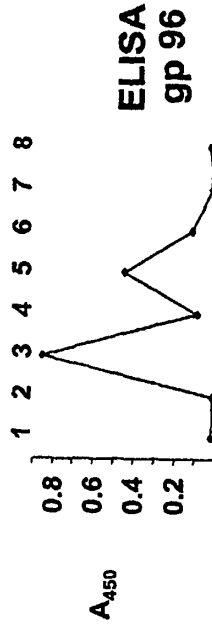
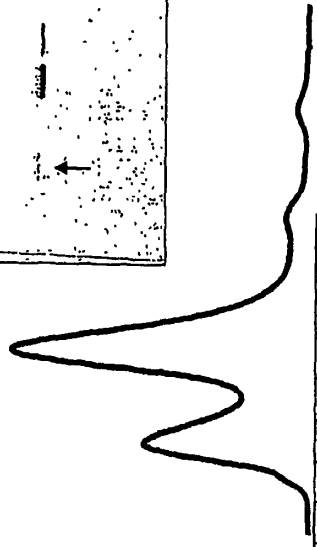
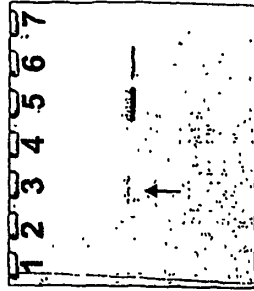


Fig. 3

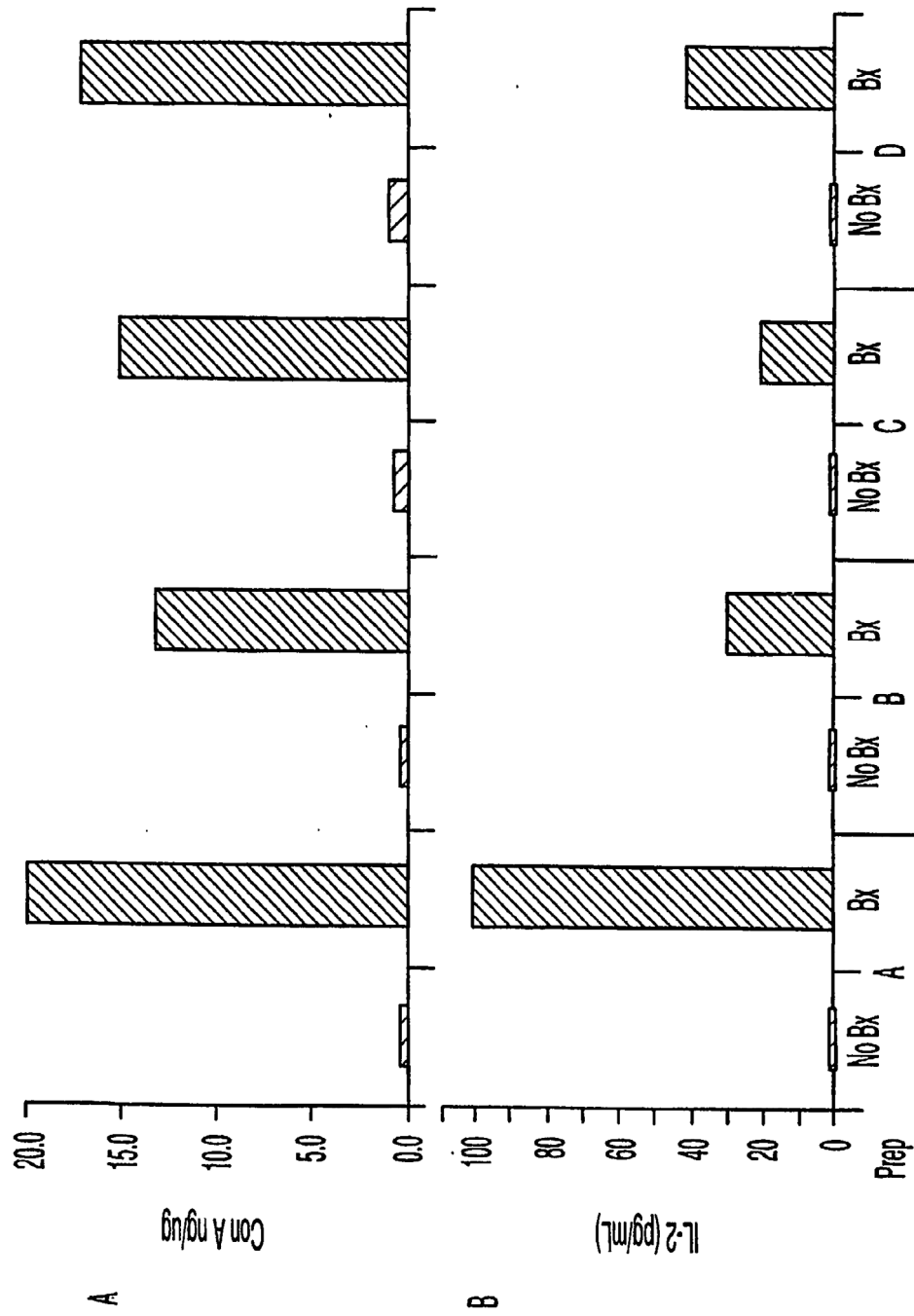


Fig. 4

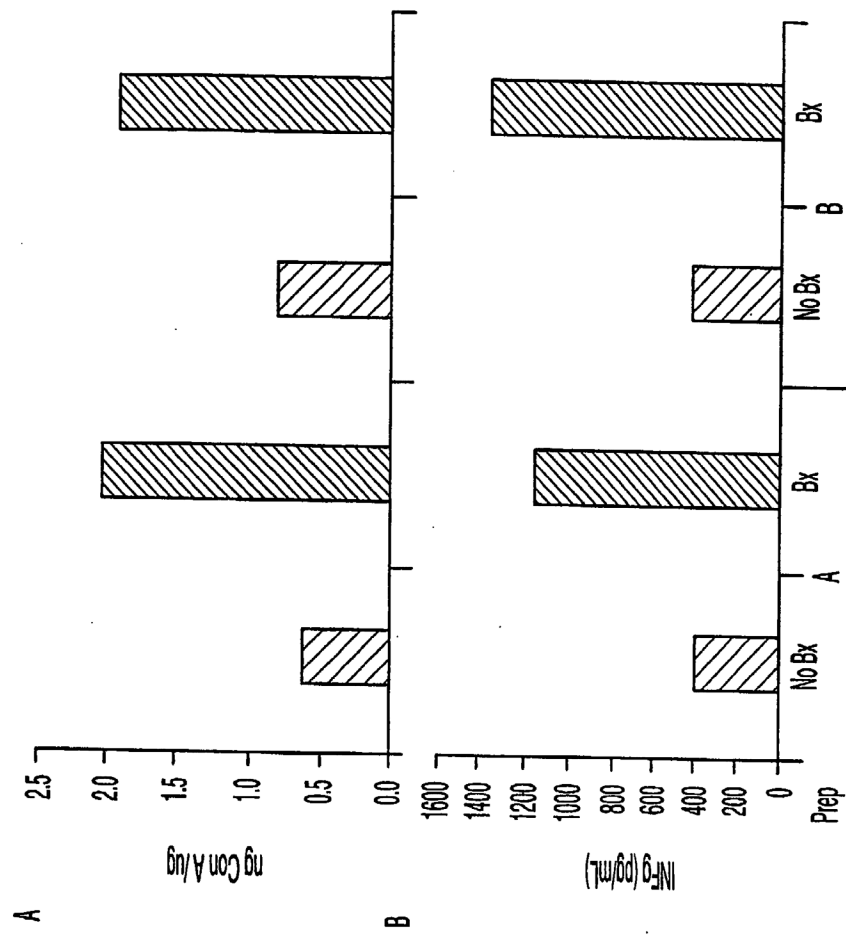


Fig. 5

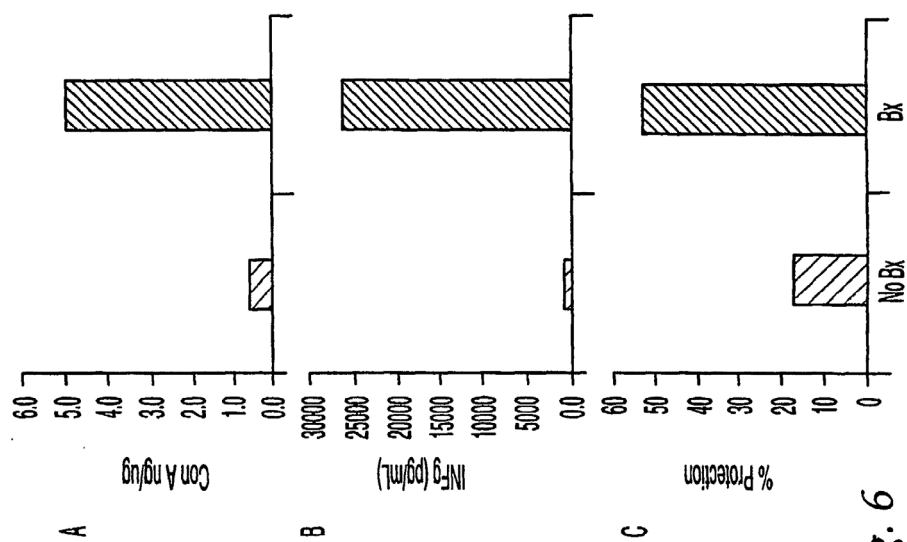


Fig. 6

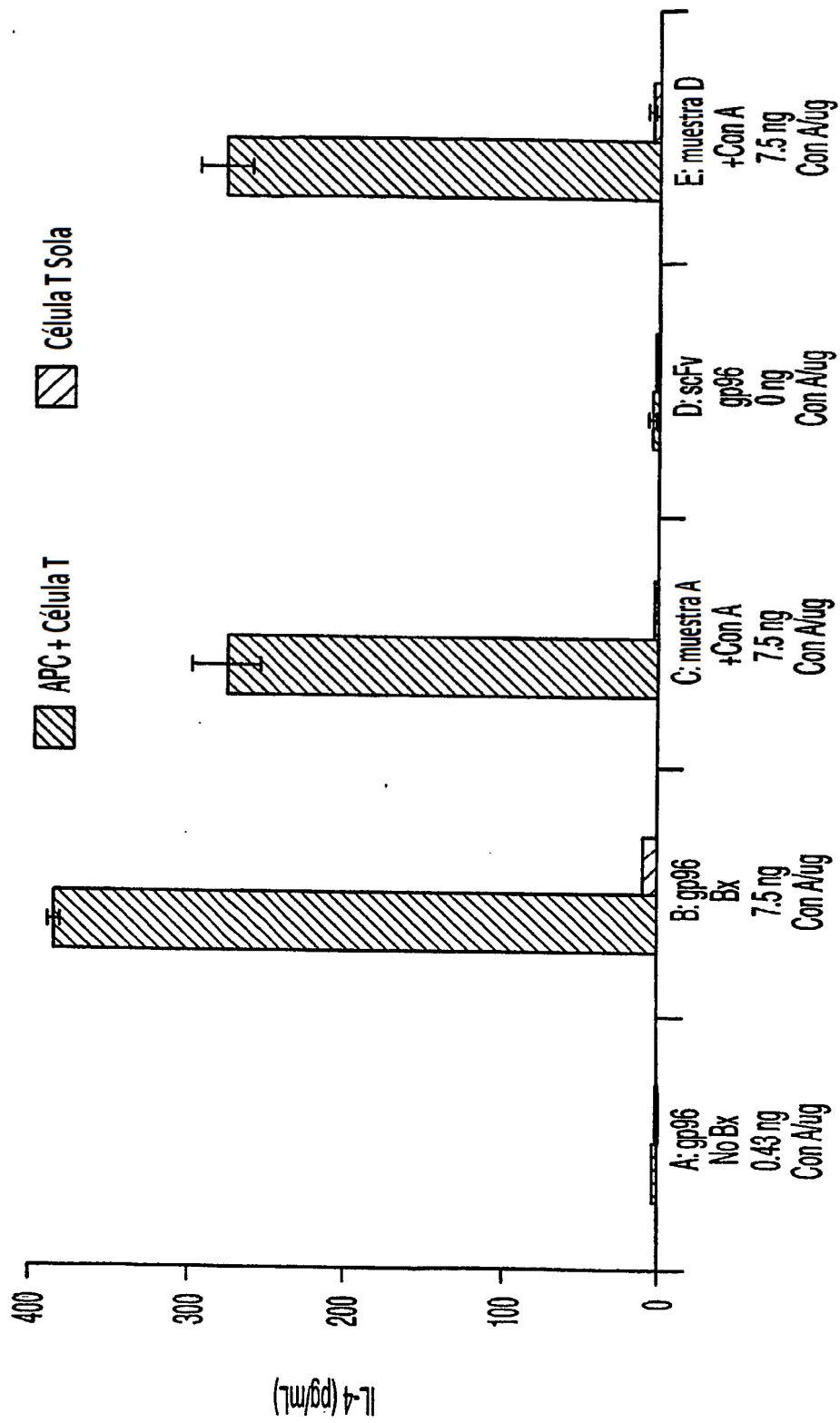
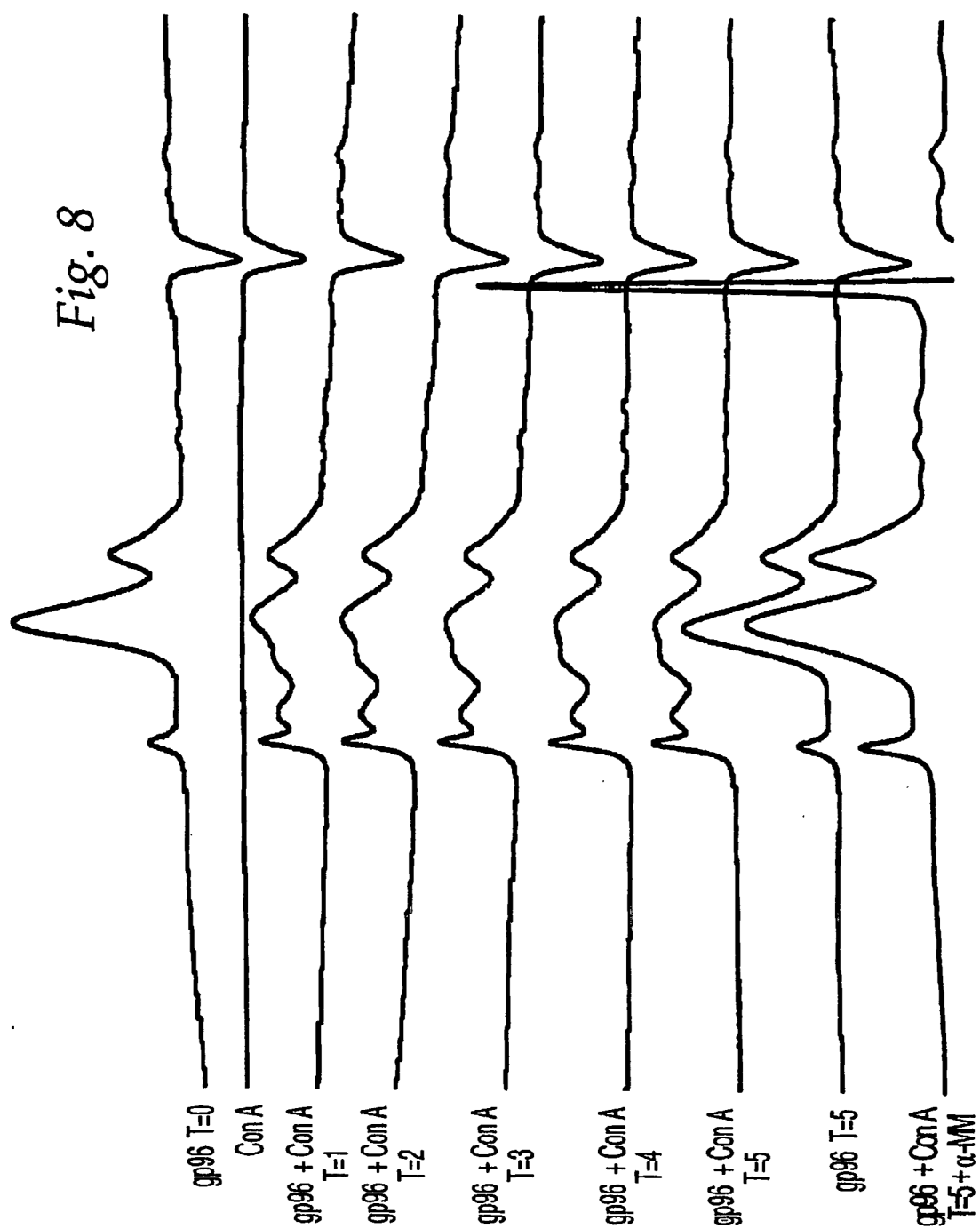


Fig. 7

Fig. 8



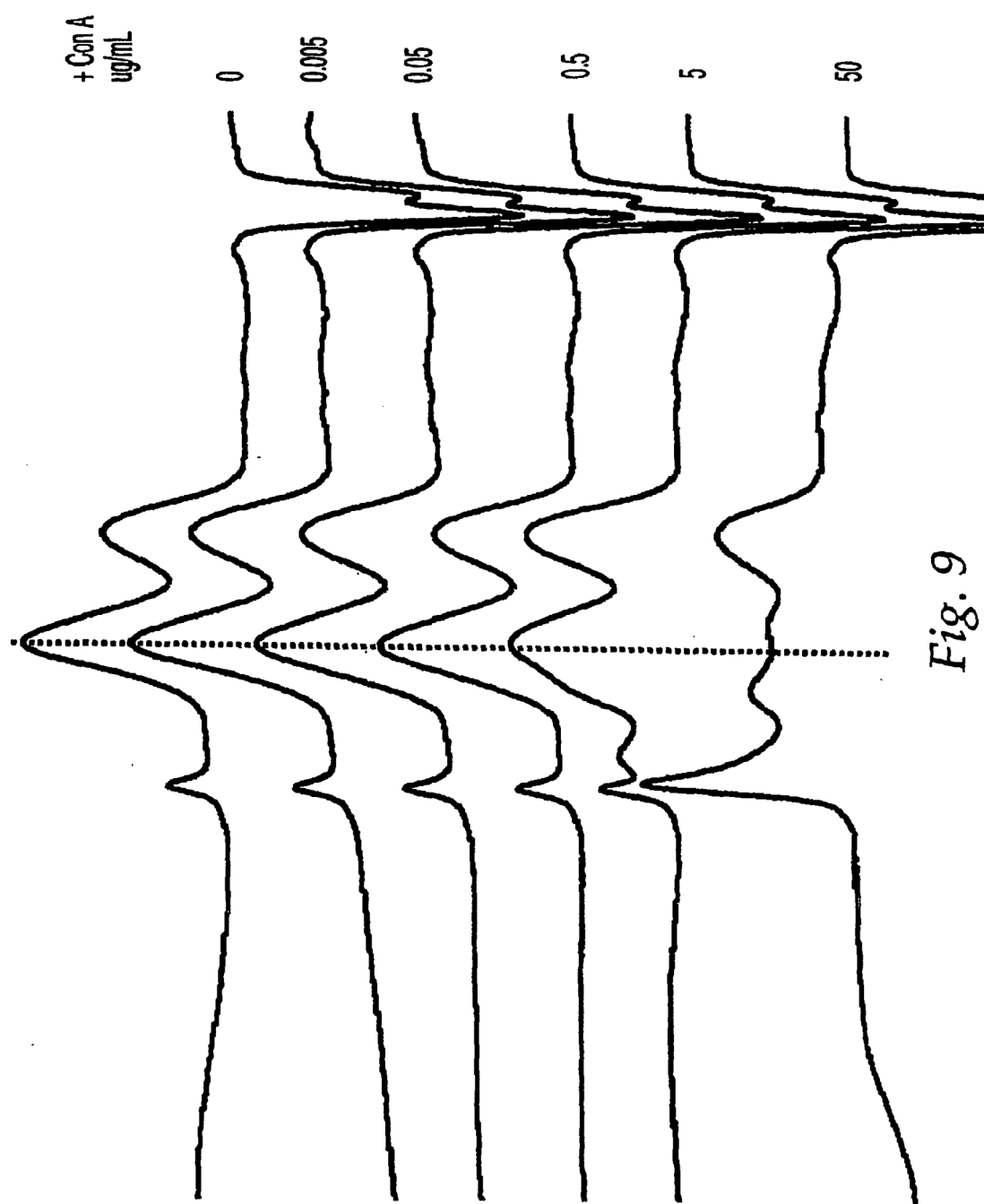


Fig. 9

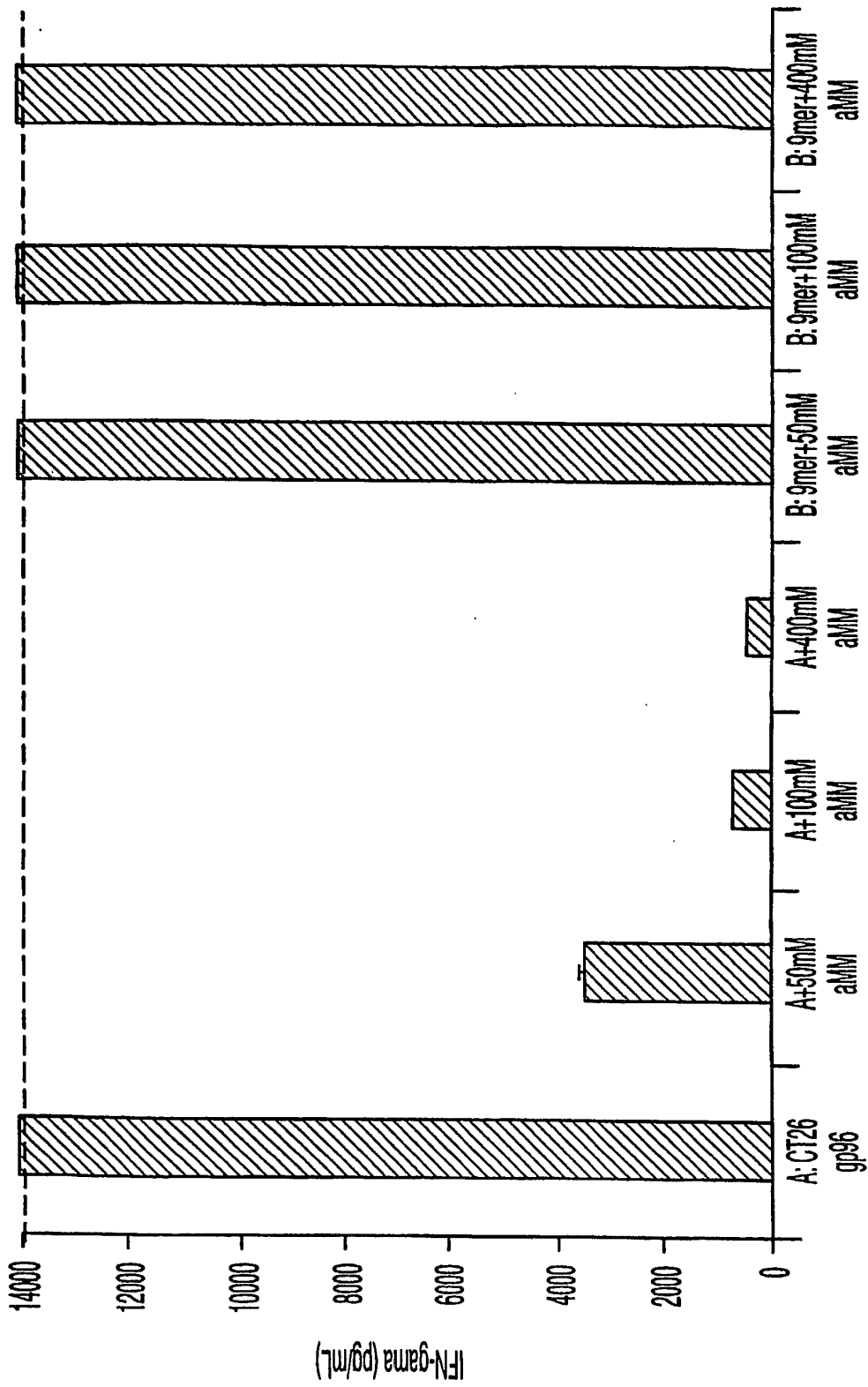


Fig. 10

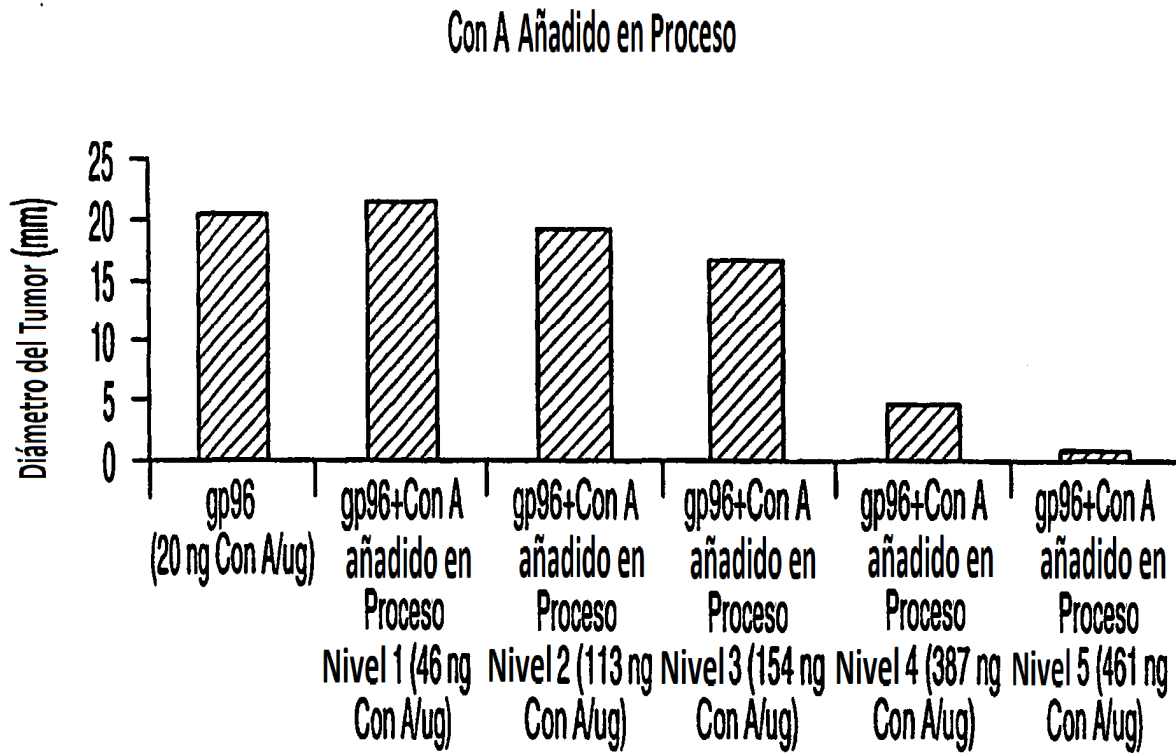


Fig. 11

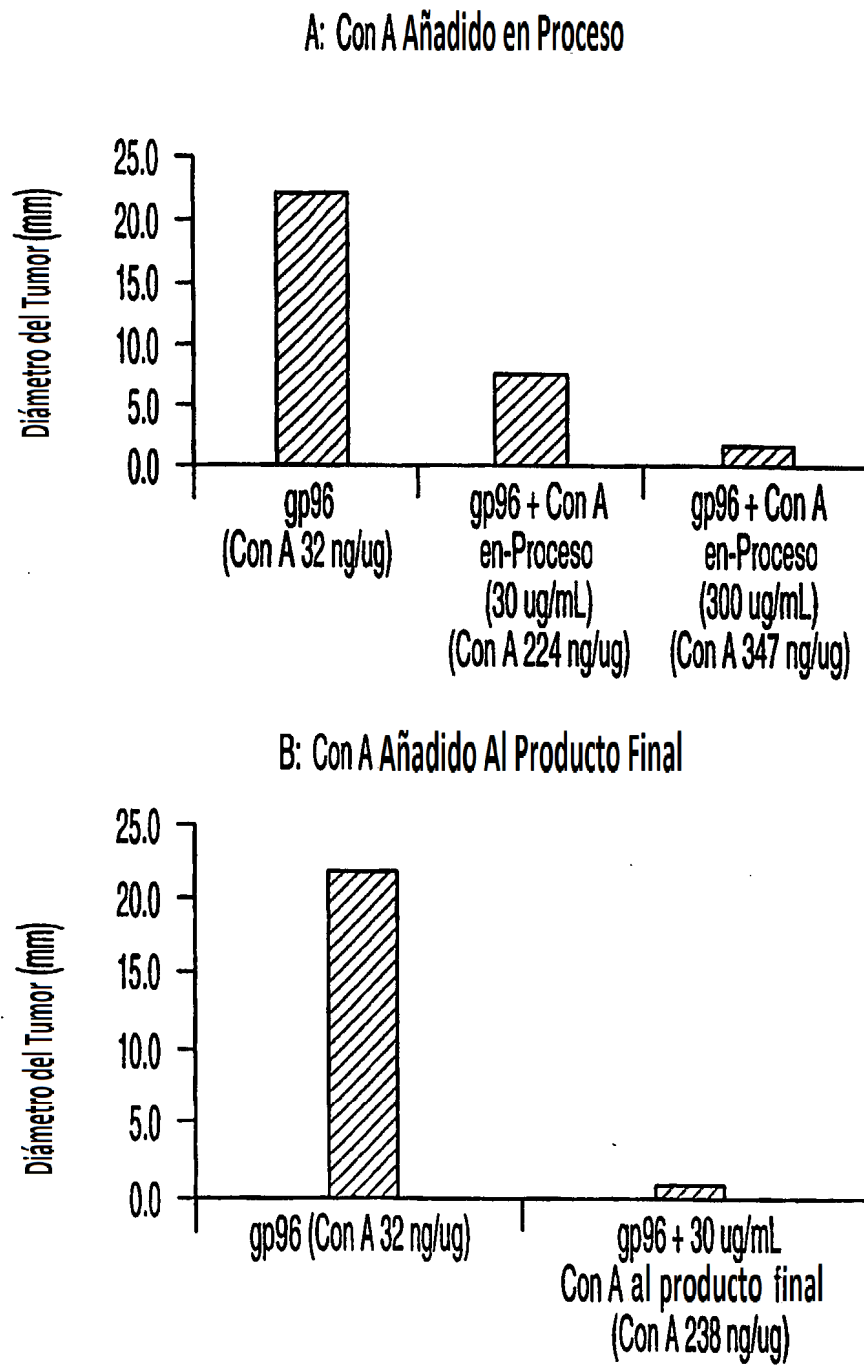


Fig. 12

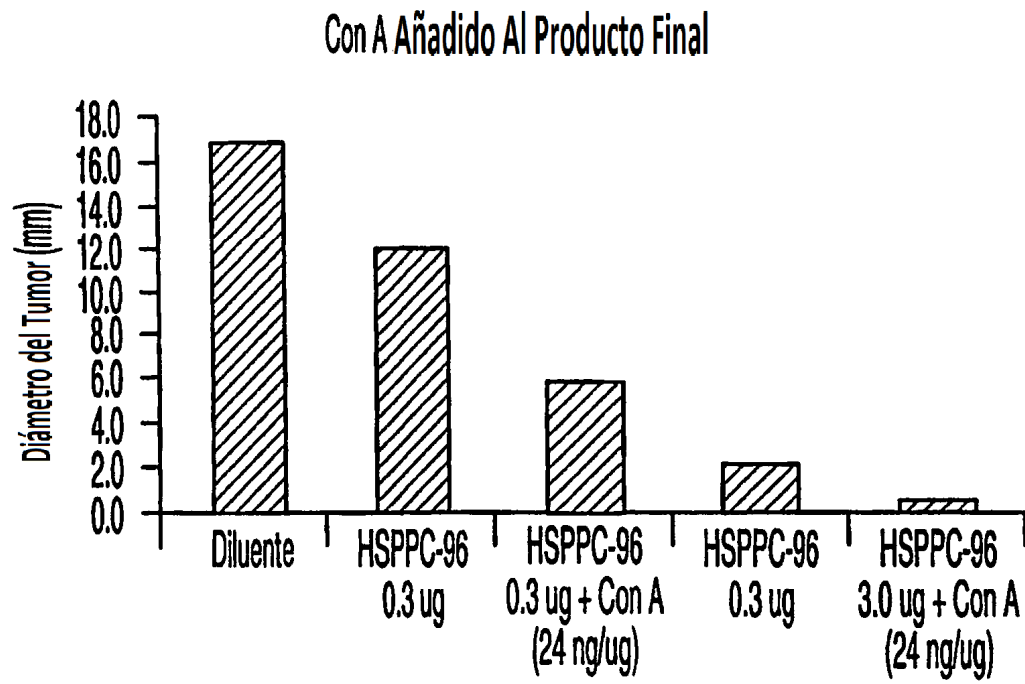


Fig. 13